

„Proteinlipoylierung in *Arabidopsis thaliana*“



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Ralph Ewald

2011

Betreuer: Universitätsprofessor Dr. Hermann Bauwe

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Bauwe (Universität Rostock)
 apl. Prof. Dr. Martin Hagemann (Universität Rostock)

Verteidigungsdatum: 28.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Photosynthese	1
1.2	Photorespiration	2
1.2.1	Photorespiratorische Gene und Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.2.2	Glycin-Decarboxylase (GDC).....	5
1.2.3	Die photorespiratorische <i>Arabidopsis</i> Mutante <i>gld1</i>	6
1.3	Fettsäuresynthese	9
1.3.1	Mitochondriale β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] (ACP) Synthase (mtKAS).....	9
1.4	Liponsäure	11
1.4.1	Liponsäure als wichtige prosthetische Gruppe	11
1.5	Mechanismen der Proteinlipoylierung	13
1.5.1	Liponsäure-Biosynthese	14
1.5.2	Lipoate-Scavenging	15
1.5.3	Lipoate-Cleavage	15
1.5.4	Proteinlipoylierung in Protozoen	16
1.5.5	Proteinlipoylierung in Pflanzen.....	17
1.6	Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung	18
1.6.1	Teil 1	18
1.6.2	Teil 2	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2	Enzyme	20
2.1.3	Größenstandards für die DNA-Gelelektrophorese	20
2.1.4	Größenstandards für die Protein-Gelelektrophorese	20
2.1.5	Verwendete Reaktionskits	21
2.1.6	Verwendete Plasmide	21
2.1.7	Radioaktive Chemikalien	21
2.1.8	Bakterienstämme	21
2.1.9	Pflanzenmaterial und Anzucht	21
2.1.10	Programme und Internetsoftware	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	23
2.2.2	cDNA-Synthese	24
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.5	Sequenzierung	25
2.2.6	Restriktionsanalysen	25
2.2.7	Ligation	26

2.2.8	Transformation kompetenter Bakterienzellen	26
2.2.9	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.2.10	Metabolitmessungen	27
2.2.11	Proteinisolation	28
2.2.12	Atmungsmessung und PDH/ KGDH-Aktivität von isolierten Mitochondrien.....	29
2.2.13	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	29
2.2.14	SDS-PAGE und Western Blot.....	29
2.2.15	Chromatographische Aufreinigung von Proteinen	30
2.2.16	Wachstumsanalysen von TM137 Zellen	31
2.2.17	<i>In vitro</i> Lipoylierung von mitochondrialen Proteinen	31
2.2.18	Expression von pflanzlichen bzw. bakteriellen Proteinen in <i>E. coli</i>	31
2.2.19	Herstellung chimärer LPLA-Proteine	32
2.2.20	LPLA-Aktivitätsmessung mit ¹⁴ C-Octanoat	33
2.2.21	Herstellung von LIP2- und AtLPLA-RNAi-Pflanzen	34
2.2.22	Transiente Expression von LIP2p2-GFP-Fusionskonstrukten	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Die EMS-Mutante <i>mtkas-1</i> hat einen Defekt in der mitochondrialen β -Ketoacyl-[ACP] Synthase (mtKAS)	36
3.1.1	Der photorespiratorische Phänotyp der Mutante <i>gld1</i> (<i>mtkas-1</i>) beruht auf einer Punktmutation im mtKAS-Gen	36
3.1.2	Aminosäuregehalte in mtKAS-Mutanten bekräftigen eine Störung im C ₂ -Zyklus	39
3.1.3	In <i>mtkas</i> -Pflanzen kommt es zu einem Anstau von Glyoxylat	40
3.1.4	<i>mtkas</i> -Mitochondrien weisen sehr geringe Decarboxylierung von Glycin auf.....	41
3.1.5	<i>mtkas</i> -Mitochondrien haben reduzierte PDH und KGDH Aktivitäten	42
3.1.6	Mitochondriale E2-Untereinheiten und das H-Protein weisen unterschiedlich starke Proteinlipoylierung in <i>mtkas</i> auf	43
3.2	Mitochondriale Proteinlipoylierung – Lipoat-protein Ligase A	47
3.2.1	Identifikation und Expression einer Lipoat-protein Ligase A (AtLPLA) in <i>Arabidopsis</i>	47
3.2.2	Die <i>Arabidopsis</i> Lipoat-protein Ligase A ist mitochondrial lokalisiert.....	50
3.2.3	AtLPLA Komplementationsanalysen und Studien der enzymatischen Aktivität.....	52
3.2.4	Die <i>Arabidopsis</i> Lipoat-protein Ligase A ist ein essentielles Enzym für die Samenentwicklung.....	59
3.2.5	AtLPLA-RNAi-Pflanzen	61
3.3	Mitochondriale Proteinlipoylierung – Interaktion des Liponsäure-Biosyntheseweges und der Photorespiration.....	64
3.3.1	Expressionsanalysen der mitochondrialen Lipoyl-Transferase.....	64
3.3.2	Mitochondriale <i>Arabidopsis</i> Blattproteine, mit Ausnahme des H-Proteins, sind nicht vollständig lipoyliert	67
3.3.3	Untersuchungen der Rolle des mitochondrialen Liponsäure-Biosyntheseweges im pflanzlichen Stoffwechsel mittels Knock-out-Mutanten	70

3.3.4	Lipoylierungsmuster in LIP2-RNAi-Pflanzen	72
3.4	Plastidäre Proteinlipoylierung	74
3.4.1	Die plastidäre Lipoat-Synthase LIP1p, jedoch nicht die plastidäre Lipoyl- Transferase LIP2p, ist essentiell	74
3.4.2	Identifikation und Expression der <i>Arabidopsis</i> Lipoyl-Transferase LIP2p2	75
3.4.3	LIP2p2-Komplementationsstudien der lipoylierungsdefizienten <i>E. coli</i> Mutante TM137	79
3.4.4	LIP2p2 und LIP2p sind redundant in <i>Arabidopsis</i>	82
4	Diskussion	86
4.1	mtKAS ist ein wichtiges, jedoch nicht obligatorisch notwendiges Enzym für die mitochondriale Proteinlipoylierung in <i>Arabidopsis</i>	86
4.2	Die Bedeutung der AtLPLA und der LIP2 in der mitochondrialen Proteinlipoylierung	88
4.3	Die chloroplastidäre Proteinlipoylierung ist autonom und beinhaltet zwei Lipoyl- Transferasen	97
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	103
7	Anhang	110
7.1	Anhang Material und Methoden	110
7.2	Anhang Ergebnisse	113
7.2.1	P0C7R2 Sequenz	113
7.2.2	LTA2-Bande im Western Blot mit LA-Antikörper	117
7.2.3	LIP2p-Spliceformen	119
7.3	Abbildungsverzeichnis	120
7.4	Tabellenverzeichnis	122
7.5	Abkürzungsverzeichnis	122
7.6	Publikationen und Tagungsbeiträge	125
7.6.1	Publikationen	125
7.6.2	Tagungsbeiträge	125

1 Einleitung

1.1 Photosynthese

Die Photosynthese ist der bedeutendste Prozess zum Aufbau von Biomasse auf der Erde. Pflanzen und Cyanobakterien nutzen die Energie des Sonnenlichts um aus anorganischen Substanzen wie CO_2 , Nitrat und Sulfat organische Verbindungen zu synthetisieren. Hierbei wird durch die Oxidation von Wasser Sauerstoff freigesetzt. Sie werden als photoautotroph bezeichnet. Diese Verbindungen wiederum sind essentiell für Organismen mit einer heterotrophen Ernährungsweise, da sie auf die Versorgung mit organischen Substanzen angewiesen sind. Diese heterotrophen Organismen, zu denen Tiere, Pilze und eine Vielzahl von Bakterien zählen, gewinnen ihre Energie durch die Oxidation der Biomasse, wodurch unter Sauerstoffverbrauch CO_2 zurückgebildet wird. Die Nutzung der Sonnenenergie in der Photosynthese stellt somit den Ausgangspunkt für die meisten Lebensprozesse auf der Erde dar. Die Photosynthese, die in Pflanzen in den Chloroplasten stattfindet, lässt sich in zwei große Abschnitte einteilen, welche als Licht- und Dunkelreaktion bezeichnet werden.

In der Lichtreaktion wird mit Hilfe der Energie von Photonen Wasser in Sauerstoff und Wasserstoff gespalten. Die Photonen werden von so genannten Lichtsammelkomplexen absorbiert. Diese Komplexe befinden sich in den Thylakoiden der Chloroplasten und bestehen aus Proteinen in denen lichtabsorbierende Pigmente, Chlorophylle und Carotinoide eingelagert sind. Die absorbierte Energie treibt eine Elektronentransportkette, bestehend aus Molekülen, die als Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor dienen, an. Der Großteil der Elektronen wird zur Reduktion von Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADP^+ zu NADPH) genutzt. Weiterhin wird die Lichtenergie genutzt um eine protonenmotorische Kraft aufzubauen, mit deren Hilfe die energiereiche Substanz Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird.

Das mit Hilfe der Lichtreaktion entstandene ATP und NADPH wird in der Dunkelreaktion, auch Calvin-Zyklus genannt, genutzt um CO_2 zu fixieren. Der Calvin-Zyklus kann in drei Teilabschnitte eingeteilt werden: die Carboxylierung, die Reduktion und die Regeneration. In der Carboxylierungsreaktion wird CO_2 mit Hilfe des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) auf Ribulose-1,5-bisphosphat übertragen, wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat entstehen. Im Reduktionsschritt wird 3-Phosphoglycerat zu Triosephosphat reduziert. Von diesen gebildeten Triosephosphaten werden fünf Sechstel für die Regenerierung von Ribulose-1,5-bisphosphat benötigt und ein Sechstel kann als Produkt für den Stoffwechsel der Zelle genutzt werden. Das regenerierte Ribulose-1,5-bisphosphat kann nun wieder als Akzeptormolekül für weitere Carboxylierungsreaktionen dienen.

1.2 Photorespiration

Wie der Name des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) schon andeutet, verfügt die Rubisco neben der Carboxylierungsaktivität ebenfalls über eine Oxygenierungsaktivität. Wird anstelle von Kohlenstoffdioxid Sauerstoff auf Ribulose-1,5-bisphosphat übertragen, entsteht neben 3-Phosphoglycerat ein für die Zelle toxisches Stoffwechselprodukt, das 2-Phosphoglycolat, welches verschiedene Enzyme des Calvin-Zyklus inhibiert (Husic et al., 1987; Norman and Colman, 1991). Das 2-Phosphoglycolat wird in mehreren enzymatischen Schritten zu 3-Phosphoglycerat regeneriert und steht somit dem Calvin-Zyklus wieder zur Verfügung. Diesen Stoffwechselweg, der vorrangig durch den amerikanischen Forscher Edward Tolbert (Tolbert, 1997) aufgeklärt wurde, bezeichnet man als Photorespiration bzw. C₂-Zyklus. Durch die Photorespiration, einem der Hauptstoffwechselwege des Primärmetabolismus in Pflanzen, können ca. 75 % des primär verlorenen Kohlenstoffes zurück gewonnen werden. Weiterhin werden der Photorespiration neben des „Recycling“ des Kohlenstoffes Funktionen im Schutz vor Photoinhibition (Kozaki and Takeba, 1996; Takahashi et al., 2007; Hackenberg et al., 2009), eine Rolle bei der Entgiftung von toxischen Intermediaten (Eisenhut et al., 2007), eine wichtige Beteiligung am C₁-Stoffwechsel (Gambonnet et al., 2001; Hanson and Gregory, 2002) und am Aminosäuremetabolismus (Keys, 2006; Schjoerring et al., 2006) sowie an der Stressabwehr (Wingler et al., 2000; Moreno et al., 2005) zugesprochen. In Pflanzen läuft der Photorespirationsweg hauptsächlich über drei Kompartimente, den Chloroplast, das Peroxisom und das Mitochondrium (Bauwe et al., 2010). Allerdings konnte in neueren Arbeiten auch eine Beteiligung des Zytosols nachgewiesen werden (Timm et al., 2008). In diesen Kompartimenten sind mehrere Enzyme am Umsatz von 2-Phosphoglycolat zu 3-Phosphoglycerat involviert. Das durch die Oxygenierungsreaktion der Rubisco entstandene 2-Phosphoglycolat wird im Chloroplast durch eine Phosphoglycolat-Phosphatase zu Glycolat dephosphoryliert (Somerville and Ogren, 1979). Das entstandene Glycolat wird ins Peroxisom transportiert und hier mit Hilfe von Glycolat-Oxidasen und Aminotransferasen zu Glycin umgesetzt. Im Mitochondrium wird aus 2 Molekülen Glycin in einem Zusammenspiel des Glycin-Decarboxylase-Komplex und der Serin-Hydroxymethyltransferase ein Molekül Serin gebildet, welches im Peroxisom durch Aminotransferasen zu Hydroxypyruvat desaminiert wird. Das Hydroxypyruvat wird nun hauptsächlich in Peroxisomen aber auch im Zytosol durch Hydroxypyruvat-Reduktasen zu Glycerat reduziert (Timm et al., 2008). Mittels ATP wird das Glycerat in den Chloroplasten zu 3-Phosphoglycerat phosphoryliert und kann nun wiederum Eingang in den reduktiven Pentosephosphatweg des Calvin-Zyklus finden (Abbildung 1.1).

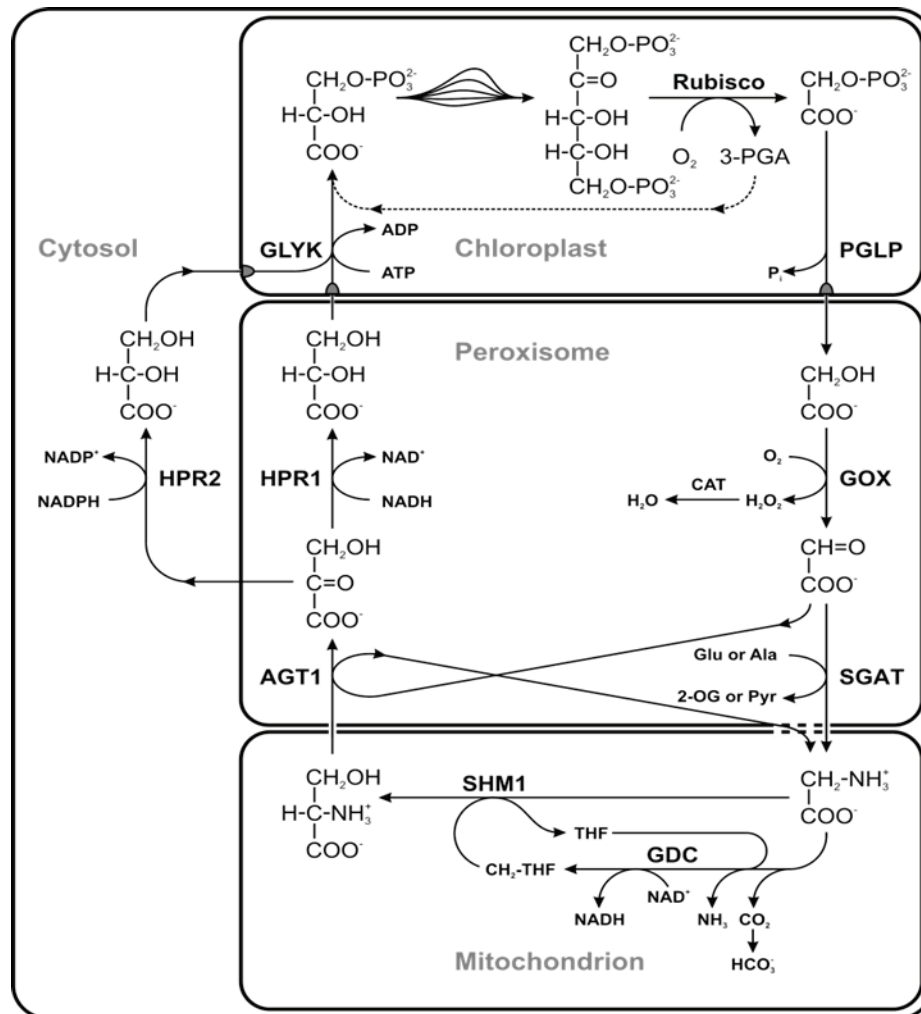


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Photorespiration in Pflanzen

Die einzelnen Reaktionen finden in 4 subzellulären Kompartimenten statt, den Chloroplasten, Peroxisomen, Mitochondrien und Zytosol. Dargestellt sind die Kernenzyme des Zyklus (Rubisco Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, PGP 2-Phosphoglycolat-Phosphatase, GOX Glycolat-Oxidase, CAT Katalase, GGT Glu:Glyoxylat Aminotransferase, GDC Glycin-Decarboxylase, SHM Serin-Hydroxymethyltransferase, AGT1 Serin:Glyoxylat Aminotransferase, HPR1/HPR2 3-Hydroxypyruvat-Reduktase, GLYK D-Glycerat-3-Kinase).

1.2.1 Photorespiratorische Gene und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Die Photorespiration und alle beteiligten Enzyme stellen seit Jahren ein wichtiges Untersuchungsobjekt für die Wissenschaft dar. Die Idee zur Untersuchungen der Photorespiration mit Hilfe von *Arabidopsis* Mutanten begann Ende der 70er Jahre. In einem Bericht über die Anfänge der Aufklärung des C₂-Zyklus nennt Chris R. Somerville die Gründe für die Wahl der mittlerweile als Modelorganismus etablierten Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Die Gründe hierfür waren z. B. die enge Verwandtschaft von *Arabidopsis* mit vielen wichtigen Kulturpflanzen, die Größe, der schnelle Regenerationszyklus, eine einfache Mutagenisierung, das kleinste bekannteste pflanzliche Genom usw. (Somerville, 2001). Die

Gruppe um Bill Ogren, in der Somerville zu diesem Zeitpunkt arbeitete, erzeugte in den folgenden Jahren die ersten *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten im photorespiratorischen C₂-Zyklus. Hierzu wurden *Arabidopsis* Samen mit der Chemikalie Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt. Diese Substanz ist mutagen und führt zu zufälligen Mutationen in DNA-Doppelsträngen. In den meisten Fällen führen diese Veränderungen bei der DNA-Replikation zu Punktmutationen, welche dann bei der Translation des entsprechenden Gens zu fehlerhaften Proteinen führen können. Die Selektion von Mutanten im photorespiratorischen Stoffwechsel erfolgte anschließend auf der Annahme, dass diese Pflanzen unter Bedingungen unterdrückter Photorespiration, hervorgerufen durch die Unterdrückung der Oxygenaseaktivität der Rubisco durch erhöhte CO₂-Gehalte der Luft, keine signifikanten Veränderungen zu Wildtyppflanzen zeigen, jedoch bei Umsatz in atmosphärische Luft sichtbare Störungen im Wachstumsverhalten aufweisen. Dieses Erscheinungsbild wird als photorespiratorischer Phänotyp bezeichnet. Pflanzen mit einem photorespiratorischen Phänotyp weisen nach Transfer in normale Luft deutliche Mangel- und Stresserscheinungen sowie Chlorosen auf. Werden die Mutanten nach Eintritt der negativen Erscheinungen wieder in erhöhte CO₂-Konzentrationen überführt, revertieren sie und wachsen normal.

Bei der Charakterisierung der betroffenen Enzyme bediente man sich vor allem radioaktiver Markierungsexperimente und Enzym-Assays, wodurch im Laufe der Jahre Mutanten der Phospho-Glycolate-Phosphatase, Serin-Glyoxylate Aminotransferase, Glycin-Decarboxylase Serin-Hydroxymethyltransferase und Glutamin-Synthase identifiziert wurden (Somerville and Ogren, 1979; Somerville and Ogren, 1980; Somerville and Ogren, 1981; Somerville and Ogren, 1982).

Durch das Bekanntwerden des vollständigen Genoms von *Arabidopsis thaliana* (Kaul et al., 2000) und der Verfügbarkeit von T-DNA-Insertionsmutanten, bei denen die Lokalisation der Mutation bekannt ist, konnten in den letzten Jahren die meisten Gene, die Enzyme der Photorespiration kodieren, identifiziert werden. Allerdings liegen bis heute durch EMS erzeugte *Arabidopsis* Mutanten vor, die einen photorespiratorischen Phänotyp aufweisen, von denen aber die exakte Natur des genetischen Hintergrundes noch ungeklärt ist.

1.2.2 Glycin-Decarboxylase (GDC)

Das bei der Photorespiration im Peroxisom gebildete Glycin wird im Mitochondrium zu Serin umgesetzt. Dieser Umsatz zu Serin wird durch die Kooperation der Glycin-Decarboxylase und der Serin-Hydroxymethyltransferase bewerkstelligt. Die GDC besteht aus vier Komponenten, die als P-Protein (Pyridoxal-5-Phosphat abhängige Glycin-Decarboxylase), T-Protein (Tetrahydrofolat(THF)-Aminomethyl-Transferase), H-Protein (mit der prosthetischen Gruppe Liponsäureamid) und L-Protein (Dihydroliponsäureamid-Dehydrogenase) bezeichnet werden (Abbildung 1.2).

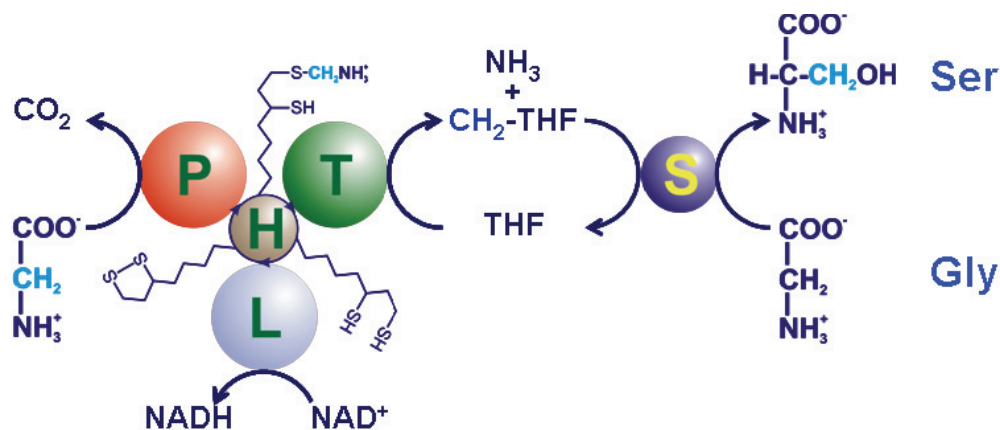


Abbildung 1.2 Der Reaktionsmechanismus der Glycin-Decarboxylase in Kooperation mit der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM).

Die Untereinheiten werden wie folgt abgekürzt: P=P-Protein, T=T-Protein, L=L-Protein, H=H-Protein, S=SHM. Der Startpunkt der GDC-Reaktion wird mit der Decarboxylierung des Glycins durch das P-Protein gesetzt. Die prosthetisch gebundene Liponsäure des H-Proteins verbindet die Intermediate mit den Reaktionszentren des P-, T- und L-Proteins.

Die GDC ist der Hauptbestandteil der pflanzlichen Blattmitochondrien und macht über ein Drittel des löslichen Proteins in den Mitochondrien der C₃-Pflanzen aus (Oliver and Raman, 1995). Bisherige Versuche die GDC als Komplex zu reinigen schlugen allerdings fehl, stattdessen wurden die vier Komponenten separat gereinigt und anschließend zur Bildung eines aktiven Komplexes genutzt (Bourguignon et al., 1988). Die Glycin-Decarboxylase oxidiert Glycin zu CO₂, NH₃ und dem C₁-Derivat N⁵, N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat. Das N⁵, N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat wird unter der Verwendung eines weiteren Moleküls Glycin durch die Reaktion der SHM zu Serin katalysiert (Oliver, 1994; Prabhu et al., 1996).

1.2.3 Die photorespiratorische *Arabidopsis* Mutante *gld1*

Im Jahr 1982 wurde eine Veröffentlichung von Somerville und Ogren mit dem Titel „Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity“ publiziert (Somerville and Ogren, 1982). In dieser Veröffentlichung wurde die Mutante *gld1* (ursprünglicher Name *glyD*), welche einen photorespiratorischen Phänotyp aufweist, mit biochemischen Methoden untersucht um die Ursache der Mutation zu ergründen. Die Autoren konnten folgende Veränderungen zu Wildtyppflanzen feststellen:

- Bei Fütterungsexperimenten mit $^{14}\text{CO}_2$ konnten sie einen beträchtlich erhöhten Anstau von markierten Glycin in *gld1* Blättern nachweisen.
- Isolierte Blattmitochondrien zeigten keinen Glycin abhängigen O_2 Verbrauch.
- Ein Umsatz von radioaktiv markiertem Glycin war mit *gld1* Blattmitochondrien nicht messbar.
- Die Rate des Glycin-Bicarbonat-Austausches (Rückreaktion des P-Proteins) belief sich in Blattmitochondrien auf Null.
- Die gemessene Menge des freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ von exogen zugeführtem ^{14}C -Glycolat war in der Mutante um das 14fache niedriger als bei Wildtyppflanzen usw.

Aufgrund der gesammelten Erkenntnisse kamen die Experimentatoren zu der Schlussfolgerung, dass die Mutation der *Arabidopsis* Mutante *gld1* in einem der 4 Komponenten der Glycin-Decarboxylase liegt. Der genetische Hintergrund der fehlenden GDC Aktivität konnte mit damaligen Analysemethoden jedoch nicht erbracht werden.

Mittlerweile konnten aufgrund der Kenntnis des Genoms von *Arabidopsis thaliana* Gene identifiziert werden, welche die Komponenten der GDC verschlüsseln. Von allen Untereinheiten des GDC liegen mehrere Isoenzymformen vor (Tabelle 1.2). Welche dieser Isoformen jedoch eine wichtige Rolle im photorespiratorischen C_2 -Zyklus einnehmen, war bis zu Beginn dieser Arbeit noch unklar. Zum jetzigen Zeitpunkt ist durch die Arbeit von Engel (Engel et al., 2007) bekannt, dass beide P-Proteine redundant wirken und *Arabidopsis* Mutanten mit einem Knock-out in beiden P-Proteinen nicht lebensfähig sind. Weiterhin konnte Engel eine T-Protein Knock-down Mutante mit einem photorespiratorischen Phänotyp isolieren und charakterisieren (Engel et al., 2008). Mit der genetischen Kartierung der *gld1* Mutante wurde bereits in der Arbeitsgruppe von Chris Somerville begonnen. Durch Kreuzungsversuche konnte der Ort der Mutation auf dem Chromosom II in einer Entfernung von ca. 40 cM zur Markerregion er-py lokalisiert werden (Artus et al., 1994). Die Mutation schien sich demzufolge an einem Ende des Chromosoms II zu befinden.

Tabelle 1.1 Überblick über GDC-Gene in *Arabidopsis thaliana*

Gen	Symbol	Mips-Nummer	Länge (AS)	Molekulargewicht	Subzelluläre Lokalisation	Referenz
H-Protein	AtGLDH1	At2g35370	165	17947.0	mitochondrial	(Srinivasan and Oliver, 1992)
	AtGLDH2	At2g35120	156	17099.9	mitochondrial	
	AtGLDH3	At1g32470	166	17897.0	mitochondrial	
L-Protein	AtGLDL1	At3g17240	507	53985.7	mitochondrial	(Lutziger and Oliver, 2001)
	AtGLDL2	At1g48030	507	53987.6	mitochondrial	
P-Protein	AtGLDP1	At4g33010	1037	112924.3	mitochondrial	(Engel et al., 2007)
	AtGLDP2	At2g26080	1044	113774.8	mitochondrial	
T-Protein	AtGLDT1	At1g11860	408	44444.5	mitochondrial	(Engel et al., 2008)
		At1g60990	432	47008.2	-----	

Auf dem Chromosom II von *Arabidopsis* befinden sich drei Gene, welche Proteine der Glycin-Decarboxylase kodieren (AtGLDH1, AtGLDH2, AtGLDP2). Aufgrund der Messungen des Glycin-Bicarbonat Austausches wurde 1994 von Artus et al. postuliert, dass die Mutation wahrscheinlich im P-Protein liege. Ein Vergleich der Lage der GDC-Gene zur er-py Markerregion auf dem Chromosom II macht jedoch ersichtlich, dass sich das Gen für das P-Protein2 wesentlich näher als 40 cM zur Markerregion befindet (Abbildung 1.3). Aus diesem Grund ergab sich die interessante Fragestellung der exakten Natur und Lokalisation der *gld1*-Mutation. Um diese Fragestellung zu klären und eine präzisere Kartierung zu erhalten, wurden im Rahmen unserer Arbeitsgruppe *gld1*-Pflanzen mit Pflanzen des Ökotyps *Landsberg erecta* (Ler-0) gekreuzt. In der F2 Generation konnten 415 Segreganten isoliert werden, die das gleiche Erscheinungsbild wie *gld1*-Pflanzen aufwiesen (verlangsamtes Wachstum, hellgrüne Blätter). Mit Hilfe von CAPS-Markern (*cleaved amplified polymorphic sequence*) (Konieczny and Ausubel, 1993) und einem *simple sequence length polymorphism* Marker (Bell and Ecker, 1994) konnte die Lage der *gld1* Mutation auf einen Bereich von ca. 100-140 kb auf dem kurzen Arm des Chromosom II eingegrenzt werden (Abbildung 1.3). Die Analyse dieses Bereiches ergab, dass in dieser Region kein Gen eines Enzyms der GDC-Untereinheiten lag. Um das defekte Gen zu identifizieren wurden T-DNA-Insertionsmutanten von einer Vielzahl der Gene dieses Bereiches analysiert.

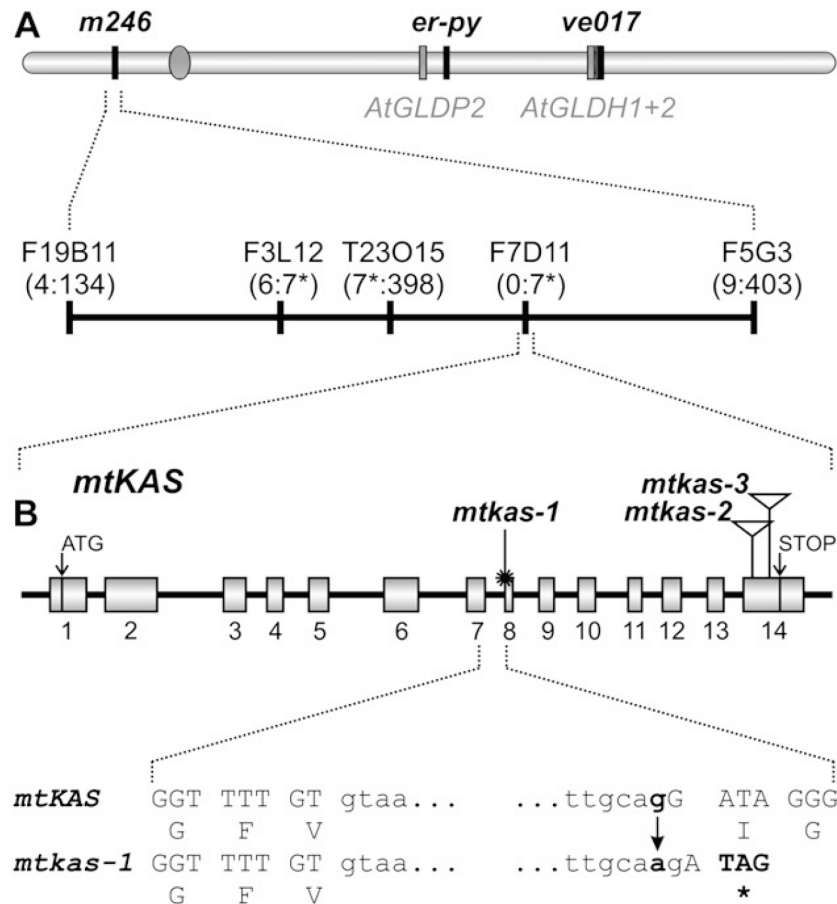


Abbildung 1.3 Die Punktmutation der GDC inaktiven Mutante *mtkas-1* liegt im *mtKAS*-Gen.

A, Kartierung von *mtkas-1* in der Nähe zu BAC F7D11 auf Chromosom II. Genutzte Marker für die Kartierung sind namentlich bzw. durch den korrespondierenden BAC Klon gekennzeichnet und ihre Position ist durch vertikale Striche dargestellt. Die Anzahl der untersuchten rekombinanten Pflanzen der F2-Generation, die mittels der jeweiligen Marker untersucht wurden, sind in Klammern aufgeführt. Die Lage der Gene der GDC ist durch graue Balken ersichtlich und die Lage des Zentromers ist durch einen grauen Kreis dargestellt.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte eine T-DNA-Insertionslinie gefunden werden, die ein vergleichbares Erscheinungsbild wie *gld1* aufwies. Diese Linie (SALK_022295) trug die T-DNA in einem Gen (At2g04540), welches eine mitochondriale β -ketoacyl-[acyl carrier protein (ACP)] Synthase (*mtKAS*) kodiert. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Sequenz des Gens von *gld1* amplifiziert, sequenziert und mit der wildtypischen *mtKAS*-Sequenz verglichen. Ein Vergleich beider Sequenzen ergab einen Austausch von Guanin zu Adenin am Ende des siebten Introns in der *gld1*-Mutante (Abbildung 1.3). Aufgrund genauer Kenntnis der Lokalisation wurde die Mutante *gld1* in *mtkas-1* umbenannt.

1.3 Fettsäuresynthese

Die Biosynthese von Fettsäuren wird von einem als Fettsäuresynthase (FAS) bezeichneten Enzym-Verbund katalysiert. In den Bakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen besteht dieser aus 6 bis 7 Enzymen, die zusammen als FAS vom Typ II bezeichnet werden (Hardie and McCarthy, 1984; McCarthy and Hardie, 1984). Tiere und Pilze hingegen besitzen im Zytosol große multifunktionelle Enzyme, bei denen alle katalytischen Zentren in Nachbarschaft auf ein bis zwei Proteinketten lokalisiert sind. Diese werden FAS vom Typ I genannt. Beide FAS-Typen arbeiten nach dem gleichen Mechanismus.

Ausgangspunkt für die Fettsäuresynthese ist das Acetyl-CoA, welches z. B. in Plastiden entweder durch eine Acetyl-CoA-Synthetase mit Hilfe von Acetat, ATP und CoA synthetisiert wird oder durch eine Pyruvat-Dehydrogenase durch den Umsatz von Pyruvat bereitgestellt wird. Beide Enzyme scheinen unterschiedliche Bedeutung während bestimmter Entwicklungsstadien der Pflanze zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass der Knock-out der plastidären Pyruvat-Dehydrogenase zu einem embryoletalen Phänotyp von *Arabidopsis* führt (Lin et al., 2003). Weiterhin fand man heraus, dass isolierte Plastiden aus Ölsamen-Endosperm, Embryonen oder Kotyledonen ^{14}C -Pyruvate, Chloroplasten aus Spinat- bzw. Gerstenblättern hingegen ^{14}C -Acetat für die Synthese von Fettsäuren bevorzugt nutzen (Ke et al., 2000). Das Acetyl-CoA ist nun wiederum Substrat für den Acetyl-CoA-Carboxylase-Multienzymkomplex, welcher Malonyl-ACP herstellt. Mit Hilfe weiterer Acetyl-CoA Moleküle kommt es dann in einer Reaktionssequenz zu einer Verlängerung um jeweils zwei C-Atome am Acyl-Carrier-Protein durch die Fettsäuresynthase (Abbildung 1.4).

1.3.1 Mitochondriale β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] (ACP) Synthase (mtKAS)

Nachdem bekannt wurde, dass in Mitochondrien Acyl-Carrier-Proteine vorkommen (Chuman and Brody, 1989), begann die Spekulation über eine autonome mitochondriale Fettsäuresynthese und den Grund für diese. 1997 konnten Wada und seine Kollegen erste Hinweise dafür erbringen, dass die in Mitochondrien synthetisierten Fettsäuren unter anderem als die prosthetische Gruppe Liponsäure am H-Protein der GDC wiederzufinden sind (Wada et al., 1997). In den darauf folgenden Jahren wurde versucht, die Fettsäuresynthase in Mitochondrien zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

Im Jahre 2004 wurde die Identifizierung und molekulare Charakterisierung einer, vom mtKAS-Gen codierten, mitochondrialen β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] (ACP) Synthase bekannt gegeben. Mittels *in vivo* (Komplementation von *E. coli* Fettsäuresynthese-Mutanten) und *in vitro* Studien konnte belegt werden, dass das mtKAS-Gen eine funktionelle Fettsäuresynthase verschlüsselt, welche vorrangig C_8 und $\text{C}_{14}\text{-C}_{16}$ lange Fettsäuren

synthetisiert. Weiterhin konnten die Forscher nachweisen, dass die mtKAS sowohl die Anfangs- als auch die Elongationsreaktion vollführen kann.

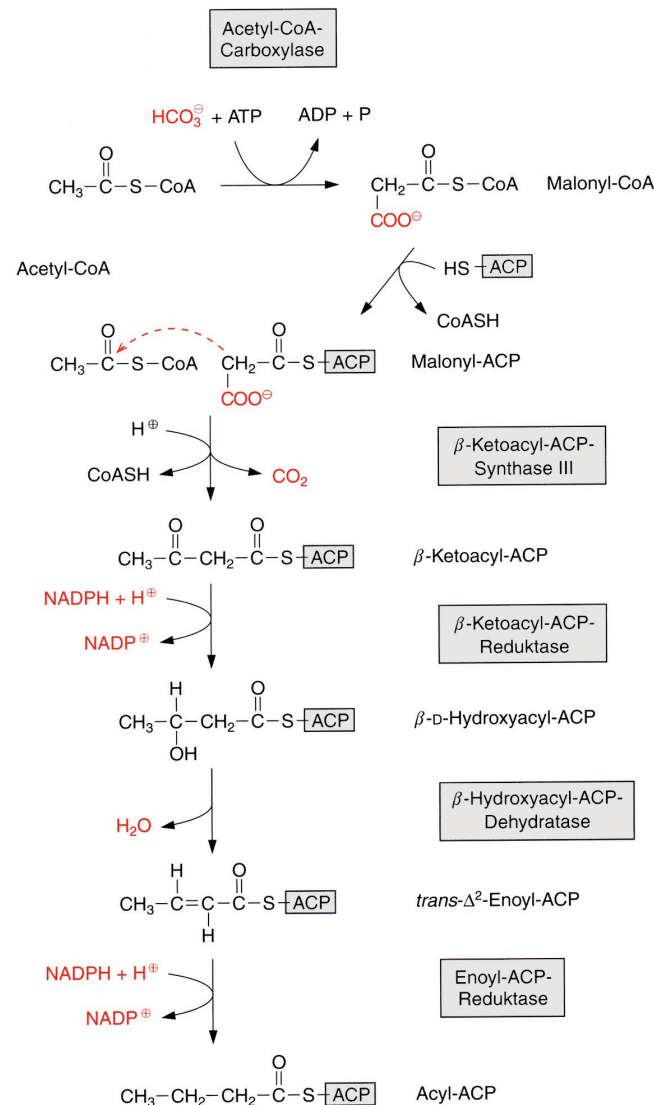


Abbildung 1.4 Reaktionsmechanismus der Fettsäurebiosynthese (Heldt, 2003)

Im Gegensatz zu anderen β -ketoacyl-ACP Synthase (KAS) Komponenten benutzt die mtKAS nur Malonyl-ACP und kein Acetyl-CoA als Substrat (Yasuno et al., 2004), wodurch eine Substrat-Konkurrenz mit dem Zitratzyklus vermieden wird. Durch die Kristallisation der menschlichen mtKAS konnten Hinweise für die Ursache des bimodalen Produktspektrums gefunden werden. Es wird angenommen, dass es durch eine Veränderung im Rotamer der Aminosäure Met154 (in *Arabidopsis* Ile154) zu einer Ausweitung der Substrattasche kommt,

wodurch längere Fettsäuren synthetisiert werden können (Christensen et al., 2007). Dieses gefundene bimodale Produktspektrum legte den Schluss nahe, dass die mtKAS eine essentielle Rolle in der Bereitstellung der Ausgangsverbindungen (C₈-Fettsäuren) für die Synthese des wichtigen Co-Faktors Liponsäure einnimmt.

1.4 Liponsäure

Liponsäure (*6,8-thioctic acid* bzw. *lipoic acid* = LA) besteht aus Octansäure, deren C₆-Atom durch eine Disulfidbrücke mit dem C₈-Atom verknüpft ist. Liponsäure liegt in Organismen entweder in freier oder in gebundener Form vor. In freier Form stellt Liponsäure ein wichtiges Antioxidanz dar (Packer and Tritschler, 1996; Koufaki et al., 2009). Durch seine Löslichkeit sowohl in der wässrigen als auch Lipid-Phase, kann es zwischen den Antioxidanzien in der Membran (α -Tocopherol) und den Antioxidanzien im Zytosol (Ascorbat, Glutathion) eine verbindende Rolle einnehmen. Im Vergleich zu anderen Antioxidanzien nimmt Liponsäure eine einzigartige Stellung ein. Sie weist sowohl in der reduzierten Form (*dihydrolipoic acid* = DHLA) als auch in der oxidierten Form (LA) protektive Funktionen auf (Biewenga et al., 1997). DHLA besitzt jedoch die höhere antioxidative Funktion und kann z. B. durch Elektronenabgabe an Ascorbat und Glutathion wiederum zur Regeneration dieser wichtigen Antioxidanzien beitragen. Beide Formen der Liponsäure haben ebenfalls Metall-chelatierende Eigenschaften und dienen auch als „Radikalfänger“ (Packer and Tritschler, 1996; Biewenga et al., 1997).

1.4.1 Liponsäure als wichtige prosthetische Gruppe

Als gebundene Form ist Liponsäure ein Bestandteil für Enzymkomplexe, die eine Schlüsselfunktion in wichtigen Stoffwechselwegen einnehmen wie z. B. der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH), Branched-Chain-Keto-Acyl Dehydrogenase (BCDH) und der Glycin-Decarboxylase (GDC). In diesen Komplexen ist Liponsäure kovalent als prosthetische Gruppe über ein Lysin an die E2-Untereinheiten bzw. das H-Protein der GDC gebunden (Abbildung 1.2) und fungiert vermittelnd als „schwingender Arm“ in diesen Enzymkomplexen (Perham, 2000). Dies sei einmal am Beispiel der PDH erläutert (Abbildung 1.5). Die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert in einem Zyklus von drei aufeinander folgenden Reaktionen die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Hierbei wird das Pyruvat durch die E1-Untereinheit (Pyruvat-Dehydrogenase bzw. –Decarboxylase) decarboxyliert und der Hydroxyethyl-Rest an Thiaminpyrophosphat (TPP) gebunden. Der C₂-Körper wird anschließend auf den Liponsäurearm der E2-Untereinheit (Dihydrolipoyl-Transacetylase) übertragen, die wiederum unter Verwendung von CoA (Trägerprotein) Acetyl-CoA synthetisiert. Die reduzierte Dihydroliponsäure wird im letzten

Schritt von der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3-Untereinheit) mit Hilfe von FAD oxidiert und steht somit für weitere Reaktionen zur Verfügung.

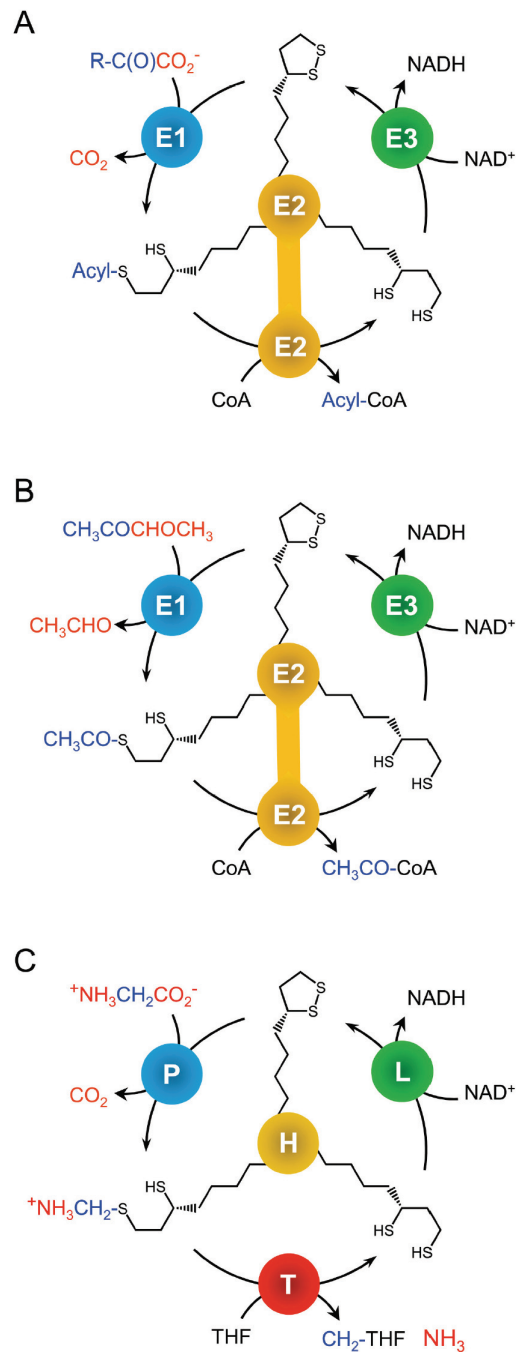


Abbildung 1.5 Reaktionsmechanismus des Liponsäurearms in α -Ketosäure-Dehydrogenasen (A), in der Acetoin-Dehydrogenase (B) und in der Glycin-Decarboxylase (C)

(Spalding and Prigge, 2010)

Diesen Reaktionsablauf kann man in ähnlicher Form bei allen α -Ketosäure-Dehydrogenasen wiederfinden. Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase setzt α -Ketoglutarat anstelle von Pyruvat

zu Succinyl-CoA um, einem Intermediat des Zitratzyklus bzw. Ausgangsstoff für die Synthese von Aminosäuren (Herbert and Guest, 1968). Der BCDH-Komplex seinerseits wandelt Branched-Chain-Aminosäuren zu Branched-Chain-CoA unter Verwendung des gleichen Mechanismus um.

Die Acetoin-Dehydrogenase, bekannt aus Bakterien, ist sehr homolog zur PDH, nutzt jedoch Acetoin (3-hydroxy-2-butanone) anstelle von Pyruvat zur Acetylierung des Lipoamidarms und setzt dabei Acetaldehyd frei (Abbildung 1.5 B).

In der Glycin-Decarboxylase vermittelt das H-Protein mittels der gebundenen Liponsäure die Übertragung des am P-Protein decarboxylierten Glycinrestes zum T-Protein, welches die C₁-Einheit an THF bindet und somit Methyl-Tetrahydrofolat (5,10-CH₂-THF) für den C₁-Stoffwechsel bzw. zur Produktion von Serin bereitstellt. Das L-Protein wiederum reduziert den Lipoamidarm und sichert somit die Verfügbarkeit des H-Proteins für weitere Glycinspaltungsreaktionen (Abbildung 1.5 C).

1.5 Mechanismen der Proteinlipoylierung

Bereits 1958 konnte gezeigt werden, dass es in Bakterien Liponsäure aktivierende Systeme gibt. Auch der Zusammenhang zwischen proteingebundener Liponsäure und enzymatischer Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase konnte belegt werden (Reed et al., 1958a; Reed et al., 1958b). Bisher konnten in Organismen zwei generelle Wege der Proteinlipoylierung identifiziert werden, zum einen der Liponsäure-Biosyntheseweg und zum anderen eine Art Recyclingweg zur Zurückführung freier LA bzw. zur Nutzung externer LA auch als „*lipoate scavenging*“ bezeichnet. Im Syntheseweg wird Liponsäure unter Nutzung von Octanoyl-ACP am Protein gebunden synthetisiert, während beim Recyclingweg freie Liponsäure oder Octansäure mit Hilfe von ATP bzw. GTP aktiviert wird und dann an die Untereinheiten gebunden werden kann. Die Wege der Proteinlipoylierung sind bisher am besten im Bakterium *E. coli* untersucht, welches über einen unabhängigen Lipoat-Syntheseweg und *scavenging pathway* verfügt. Aber auch in Säugetieren konnten beide Wege identifiziert werden, wobei der *scavenging pathway* sich jedoch durch die Beteiligung eines vorrangig GTP nutzenden Lipoat-aktivierenden Enzyms (LAE) und einer Lipoyl-NMP-Transferase, die keine freie Liponsäure nutzen kann, unterscheidet (Abbildung 1.6). In *E. coli* erfolgt diese Reaktion mittels ATP und wird von einem Enzym einer so genannten Lipoat-protein Ligase A (LPLA) vermittelt, welche sowohl die Aktivierung zu Lipoyl-AMP als auch das Anbringen der Liponsäure an die jeweiligen Apoproteine bewerkstelligt. Für die Biosynthese von fertigen Holoproteinen wiederum sind in *E. coli* zwei andere Enzyme notwendig, wie im Folgenden geschildert.

1.5.1 Liponsäure-Biosynthese

In *E. coli* erfolgt die Lipoat-Synthese durch eine zweigeteilte Reaktion an welcher die Octanoyl-acyl carrier protein (ACP):protein N-octanoyltransferase (LIPB, kurz: Lipoyl-Transferase) und die Lipoat-Synthase (LIPA) beteiligt sind (Hayden et al., 1992; Reed and Cronan, Jr., 1993; Hayden et al., 1993; Morris et al., 1995).

LIPB transferiert die Octanoyl-Gruppe vom Octanoyl-Acylcarrierprotein (Octanoyl-ACP) auf die jeweiligen Apoproteine (Jordan and Cronan, Jr., 2003). Hierbei wird die Octanoyl-Gruppe zuerst über eine Thioester-Bindung an das Enzym gebunden wodurch ein stabiles Acyl-Enzym-Intermediate entsteht und dann an das jeweilige Lysin der Apoproteine kovalent gebunden (Zhao et al., 2005; Ma et al., 2006). Die Lipoyl-Transferase ist nicht in der Lage effektiv Octanoate bzw. Liponsäure als Substrat zu nutzen, weswegen sie auf die Versorgung durch eine Type II Fettsäuresynthase angewiesen ist, welche Octanoyl-ACP liefert (Jordan and Cronan, Jr., 2003).

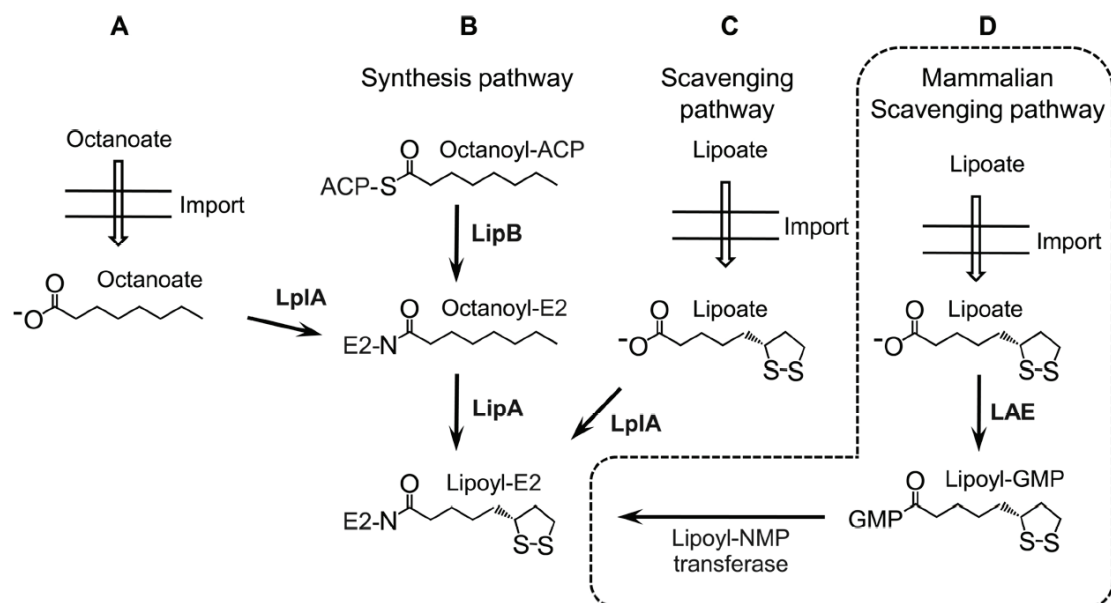


Abbildung 1.6 Strategien der Proteinlipoylierung

(Spalding and Prigge, 2010)

Im zweiten Schritt vervollständigt die Lipoat-Synthase (auch Lipoyl-Synthase genannt) die Synthese von Liponsäure indem sie unter Verwendung von S-Adenosyl-L-Methionin zwei Schwefelatome in Position C₆ und C₈ der korrespondierenden Fettsäure inseriert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym, welches ein Eisen-Schwefel-Cluster enthält, Octanoyl-E2-Untereinheiten bzw. Octanoyl-H-Protein und nicht Octanoyl-ACP als Targetproteine

verwendet (Zhao et al., 2003; Cicchillo et al., 2004; Booker, 2004; Cicchillo and Booker, 2005).

1.5.2 Lipoate-Scavenging

Die Nutzung bzw. Zurückführung (engl. *scavenging*) von freier Liponsäure wird in *E. coli* von einem weiteren Lipoylierungsenzym übernommen, welches als Lipoat-protein Ligase A (LPLA) bezeichnet wird (Morris et al., 1995). Die Lipoat-protein Ligase A nutzt verfügbare freie Liponsäure zur Modifizierung der spezifischen Lysine der Lipoyl-Domänen. Dies geschieht unter Verwendung von ATP, was zur Synthese eines Lipoyl-5'-Adenylat-Intermediates (Lipoyl-AMP) notwendig ist. Die aktivierte Lipoyl-Gruppe kann so an das jeweilige Lysin der Apoproteine gebunden werden. Durch Proteinkristallisation und vergleichende Sequenzanalysen konnten hoch konservierte Domänen, z. B. wichtig für die Bindung von Lipoyl-AMP, in allen identifizierten LPLAs gefunden werden (Kim et al., 2005; Fujiwara et al., 2005). Enzymatische Tests belegen, dass die LPLA aus *E. coli* auch mit Octansäure, der Vorstufe von Liponsäure, hohe enzymatische Aktivität aufweist. Ebenfalls konnten, jedoch nur sehr gering, enzymatische Umsätze mit Octanoyl-ACP detektiert werden. Diese Umsätze sind allerdings um ca. das 100fache geringer als mit Liponsäure, was eine physiologische Relevanz *in vivo* unwahrscheinlich erscheinen lässt (Morris et al., 1995). Durch die Herstellung und Untersuchung von *E. coli* Mutanten konnte bewiesen werden, dass es sich bei beiden Lipoylierungswegen um redundante Stoffwechselwege handelt. Knock-out-Mutanten sowohl im Biosyntheseweg, bei Gabe externer Liponsäure/Octansäure, als auch im LPLA abhängigen Lipoylierungsweg konnten ohne Anzeichen von Schädigungen oder Veränderungen wachsen (Morris et al., 1995).

In Säugetieren hingegen übernimmt die Aktivierung freier Liponsäure ein GTP abhängiges Lipoat-aktivierendes Enzym (LAE). Das entstandene Lipoyl-GMP wird nun wiederum von einer Lipoyl-NMP-Transferase genutzt (Abbildung 1.6 D) um die jeweiligen Zielproteine zu lipoylieren (Fujiwara et al., 2001).

1.5.3 Lipoate-Cleavage

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur ein Enzym bekannt welches die Lipoamidbindung spalten kann (engl.: *cleavage* = Abschnitt, Spaltung). Eine sogenannte Lipoamidase (LPA) konnte nur im Gram-positiven Bakterium *Enterococcus faecalis* identifiziert werden. Die LPA ist ein ca. 80 kDa großes Enzym mit einer N-terminalen Amidase Domäne und einer C-terminalen Domäne von unbekannter Funktion (Jiang and Cronan, 2005). Die Expression in *E. coli* Stämmen, die auf den Liponsäure-Metabolismus angewiesen sind, ist toxisch da LPA Lipoat von α -Ketosäure-Dehydrogenasen abpaltet (Suzuki and Reed, 1963).

Auch in Säugetierseren konnte Lipoamidase-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings scheint diese Lipoamidase-Aktivität im Gegensatz zur *E. faecalis* LPA Aktivität keine Spezifität für Lipoat zu haben, da ebenfalls Biotin abgespalten wird. Somit wird dieses Enzym auch als Biotinidase bezeichnet (Garganta and Wolf, 1990).

1.5.4 Proteinlipoylierung in Protozoen

In den letzten Jahren hat die Erforschung des Liponsäure-Metabolismus in Malaria-Erregern aus der Gruppe der Apicomplexan wichtige Erkenntnisse über die beteiligten Enzyme der Proteinlipoylierung dieser parasitär lebenden Organismen erbracht. Diese Erkenntnisse liefern Ansatzpunkte, die eines Tages helfen könnten, medikamentöse Therapien im Kampf gegen diese lebensbedrohlichen Parasiten zu entwickeln (Allary et al., 2007).

Die meisten Apicomplexan besitzen zwei endosymbiotische Organellen, das Mitochondrium und einen so genannten Apicoplasten. Der Apicoplast kann als nichtphotosynthetisches Relikt eines Plastiden angesehen werden, von dem angenommen wird, dass er aus sekundärer Endosymbiose stammt (Roos et al., 1999; Gould et al., 2008).

In beiden Organellen konnten Enzyme für die Proteinlipoylierung identifiziert werden, jedoch kann Liponsäure nur im Apicoplasten via *de novo* Synthese synthetisiert werden (Crawford et al., 2006). Zwei Enzyme, die Ähnlichkeit mit der Lipoat-protein Ligase A aus *E. coli* aufweisen, befinden sich in Mitochondrien von *Plasmodium falciparum*. Diese Lipoat-protein Ligasen A, PfLIPL1 und PfLIPL2 (Allary et al., 2007) versorgen die Apoproteine der KGDH, BDCH und das H-Protein im *scavenging-pathway* mit Liponsäure. Knock-out-Studien belegen, dass hierbei die PfLIPL1 eine essentielle Rolle für den sich im asexuellen Blut-Stadium befindlichen Parasiten einnimmt (Günther et al., 2009). Der Parasit ist demzufolge auf die Versorgung mit Liponsäure durch seinen Wirt angewiesen und kann durch Gabe von Liponsäure-Analoga im Wachstum gehemmt werden. Diese Abhängigkeit des Parasiten von exogener Liponsäure liefert Ansatzpunkte für medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten, die dazu beitragen könnten, eine der gefährlichsten Krankheiten tropischer Regionen zu bekämpfen.

Die sich im Apicoplasten befindende PDH wiederum wird hauptsächlich mit Hilfe einer Lipoyl-Transferase und einer Lipoat-Synthase in einem Lipoat-Syntheseweg mit der prosthetischen Gruppe versehen. Der Knock-out von LIPB ist nicht letal, trotz > 90 % geringerer Lipoylierung und kann durch das Vorkommen der Lipoat-protein Ligase A2 (*dual targeting*) erklärt werden (Günther et al., 2007).

Funktionsnachweis wurde durch die Komplementation der *E. coli* Mutante TM137 (Morris et al., 1995) erbracht, die einen Knock-out sowohl in der Lipoyl-Transferase als auch in der Lipoat-protein Ligase A (*lipB/lplA*) aufweist.

Im Gegensatz zu *E. coli* und *Plasmodium falciparum*, bei denen die Enzyme und Mechanismen der Proteinlipoylierung physiologisch gut untersucht sind, steht die Aufklärung dieser Stoffwechselwege in Pflanzen noch relativ am Anfang. Zwar konnten, wie beschrieben, die Gene für Enzyme der Lipoat-Synthese in *Arabidopsis* mit Hilfe von Sequenzvergleichen und Komplementationsversuchen identifiziert werden, die Notwendigkeit bzw. die physiologische Bedeutung dieser Enzyme wurde jedoch noch nicht ermittelt. Bis dato war zudem unklar, ob das Genom von *Arabidopsis* ebenfalls eine LPLA verschlüsselt und wenn ja, welche Funktion dieses Enzym in Pflanzen übernimmt.

1.6 Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung

1.6.1 Teil 1

Die anfängliche Aufgabe bestand in der näheren Charakterisierung der *gld1* Mutante (*mtkas-1*), deren Punktmutation zu diesem Zeitpunkt von unserer Arbeitsgruppe mittels Kartierungsexperimenten (*mapping*) und vergleichender Analyse mit T-DNA-Insertionsmutanten bestimmt werden konnte. Nun galt es abzusichern, dass die ähnlichen äußeren Erscheinungsbilder der EMS-Mutante und einer T-DNA-Insertionsmutante (SALK_022295) wirklich desselben Ursprungs waren, sprich durch eine alleinige Mutation im mtKAS-Gen hervorgerufen wurden. Dies sollte mittels Kreuzungsversuchen und physiologischer und biochemischer Vergleiche der Mutanten bewiesen werden. Diese Untersuchungen sollten zudem auch Anhaltspunkte für die Klärung der Fragestellung liefern: "Wodurch wird ein photorespiratorischer Phänotyp bei einer Mutante mit einem Defekt in der Fettsäuresynthese im Mitochondrium hervorgerufen?". Die Vermutung lag nahe, dass durch einen Defekt der mtKAS die Bereitstellung von C₈-Fettsäuren (Octanoyl-ACP) für die Liponsäure-Biosynthese beeinträchtigt ist. Liponsäure wiederum ist eine essentielle prosthetische Gruppe des H-Proteins der GDC, welche eine wichtige Rolle im photorespiratorischen C₂-Zyklus einnimmt. Aus diesem Grund sollte der Liponsäure-Gehalt des H-Proteins und weiterführend auch der Lipoylierungsstatus anderer Lipoat-abhängiger Enzyme ermittelt werden.

1.6.2 Teil 2

Durch die physiologischen und biochemischen Charakterisierungen der *Arabidopsis* mtKAS-Mutanten wurden neue Befunde aufgezeigt, die zu weiteren wissenschaftlichen Fragestellungen führten.

In den *mtkas*-Pflanzen konnte ein unterschiedlich starkes „Restlipoyierungsmuster“ der verschiedenen E2-Untereinheiten und des H-Proteins detektiert werden, was die homozygoten Mutanten dazu befähigt, zu überleben. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, dass die mtKAS ein essentielles Enzym für die Versorgung der mitochondrialen Proteinlipoylierung mit C₈-Fettsäuren darstellt. Zudem deutete die unterschiedlich stark reduzierte Restlipoylierung der einzelnen Apoproteine darauf hin, dass es auch Unterschiede in der Proteinlipoylierung verschiedener Lipoat-abhängiger Enzyme gibt. Ein weiterer Befund zeigte, dass die Lipoyierungslevel in der Wurzel im Gegensatz zum Blatt keinerlei Veränderung zu Wildtypmitochondrien aufwiesen, was wiederum die Frage nach der Ursache dieser Entdeckung aufwarf.

Die Zielstellung der weiteren Forschung galt demzufolge der Erforschung der Mechanismen der Proteinlipoylierung in Pflanzen. Im Gegensatz zu Bakterien, in denen die Wege der Lipoylierung von Proteinen schon ausführlicher untersucht wurden, schien es in Pflanzen noch Aufklärungsbedarf zu geben. Zwar konnte bisher gezeigt werden, dass sowohl der Chloroplast als auch das Mitochondrium von *Arabidopsis* über funktionelle Enzyme des Liponsäure-Syntheseweges verfügen, jedoch war unklar, ob noch andere Enzyme bzw. Lipoyierungswege in diesen Kompartimenten an der Proteinlipoylierung beteiligt sind. Die Funktionalität der bis dato identifizierten Enzyme wurde durch Komplementation von Liponsäure auxotrophen *E. coli* Mutanten bestätigt, allerdings wurden die Bedeutung und die Funktion dieser Enzyme für den pflanzlichen Stoffwechsel, z. B. durch Charakterisierung von *Arabidopsis* Mutanten, nie analysiert. Somit bestand die Aufgabe in der Vervollständigung des Kenntnisstandes der Proteinlipoylierung in *Arabidopsis*, um die Gründe der ungewöhnlichen Proteinlipoylierung in mtKAS-Mutanten aufzuklären.

2 Material und Methoden

Aufgrund kooperativer Zusammenarbeit sowie des Praktizierens am selben Lehrstuhl wurden einige Material- und Methodenabschnitte (allgemeiner Natur) aus der Dissertation von Nadja Engel übernommen (Engel, 2010).

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und allgemein gebräuchlichen Verbrauchsmaterialien entsprachen einem analytischen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Osterode), Hettich Zentrifugen (Tuttlingen), Invitrogen (Leck, NL), Kodak (Stuttgart), Macherey-Nagel (Düren), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Millipore (Eschborn), New England BioLabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen), Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Schott Glaswerke (Mainz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Sorvall (Bad Homburg), Whatman (Maidstone,GB).

2.1.2 Enzyme

Desoxyribonuklease I, RNase frei (MBI Fermentas)

H MinusM-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas)

Restriktionsenzyme diverse (MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England BioLabs, Frankfurt)

T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)

Factor-Xa (Promega)

E. coli LPLA (Hasse et al., 2009)

2.1.3 Größenstandards für die DNA-Gelelektrophorese

100 bp Marker (MBI Fermentas)

1 kb Leiter (MBI Fermentas)

Lambda DNA/ EcoRI+HindIII Marker (MBI Fermentas)

2.1.4 Größenstandards für die Protein-Gelelektrophorese

Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 (MBI Fermentas)

Page Ruler™ Protein Ladder #SM0661 (MBI Fermentas)

2.1.5 Verwendete Reaktionskits

NucleoSpin® Extract II PCR clean-up and gel extraction (Macherey-Nagel)

NucleoSpin® RNA plant kit (Macherey-Nagel)

RevertAid H Minus cDNA synthesis kit (MBI Fermentas)

Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)

Technovit 8100 (Heraeus Kulzer)

2.1.6 Verwendete Plasmide

pASK-IBA7plus (<http://www.iba.org/>)

pBAD-His-A (<http://www.invitrogen.com>)

pGEM-Teasy (<http://www.promega.com>)

pGreen-0179 (<http://www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm>)

pGreen-35S-Kassette (<http://www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm>)

2.1.7 Radioaktive Chemikalien

Octanoic acid-carboxy-¹⁴C sodium salt (Sigma-Aldrich)

2.1.8 Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*)-Stämme:

BL21 StarTM(DE3) F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)

DH5 alpha F- endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZdeltaM15
hsdR17

TM137 rspl lipB182::Tn1000dKn::lplA329::Tn10dTc

K12 (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Rostock)

Agrobacterium tumefaciens-Stämme:

GV3101+ pSOUP pMP90 (pTiBo542_T-DNA) pSOUP in C58C1;Rifr, Gentr, Tetr

2.1.9 Pflanzenmaterial und Anzucht

Das in dieser Arbeit verwendete Samenmaterial wurde von dem Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC; <http://arabidopsis.info/>), *Arabidopsis* Biological Resource Centre (Alonso et al., 2003) bezogen. Samen der *mtkas-1* Mutante (*gld1* = CS8012) wurden von Jitao Zou (Saskatoon, Kanada) zur Verfügung gestellt. Der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp

Columbia (Columbia-0; Col-0) wurde als wildtypische Kontrolle verwendet. Zur Stratifikation wurden die Samen für zwei Tage bei 4 °C inkubiert. Die Sämlinge und Pflanzen wurden bei 12-h-Licht ($100-150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/12-h-Dunkel-Zyklus (22 °C/ 18 °C) auf einem Erde-Vermiculite-Gemisch 4:1 (Type VM, Einheitserdewerk, Uetersen, Germany) in Percival Wachstumskammern angezogen. Die Düngung erfolgte alle 14 Tage mit 0.1% Wuxal (Aglukon Spezialdünger GmbH, Düsseldorf, Germany).

Für die Selektion transformierter Pflanzen keimten die Samen auf Hygromycin-Platten, d. h. $\frac{1}{2}$ -MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) inklusive von Vitaminen und 1% Agar und 20µg/ml Hygromycin. Die Pflanzen wurden nach zwei Wochen auf Erde umgesetzt.

Für einige Experimente wurden die Pflanzen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (0,15 % CO₂) bei 12/12-h Licht/Dunkel-Zyklus ($100-150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 22 °C/ 18 °C) in Wachstumskammern kultiviert.

2.1.10 Programme und Internetsoftware

Statistische Analysen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2003 angefertigt.

Für die Erstellung von Alignments und Sequenzanalysen wurden folgende Programme verwendet:

- Clone Manager 5
- BioEdit
- Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008)

Die Bildbearbeitung erfolgte mit Microsoft PowerPoint 2003 und CorelDraw 12.

Die *Arabidopsis* Transkriptdaten wurden der Internetsoftware „Genevestigator“ entnommen (www.genevestigator.ethz.ch/at). Für weitere Untersuchungen, Analysen und Literaturrecherchen wurde auf die Softwaretools der Internetseiten NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) ExPASy (www.expasy.org) und BAR (<http://bar.utoronto.ca/>) zurückgegriffen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

DNA-Isolation

Für die DNA-Isolation wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Destroy-Stick oder Mörser in 500 µl 2x CTAB homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 68 °C wurde die Proben mit 5 µl RNaseA (5 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 VT Cl. Die Proben wurden gründlich gemischt und 5 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 1 VT Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 20 min. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen und zum Trocknen unter die Laminarbox gestellt. Nach 15 min wurde die isolierte DNA in 50 µl Tris-HCl (pH-Wert 8,0) gelöst und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

[illegible]

2x CTAB-Puffer:

- 2 % CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
- 1,4 M NaCl
- 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 20 mM EDTA

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA plant kit (Macherey-Nagel). Im ersten Arbeitsschritt wurde der alternative RAP-Puffer verwendet.

Plasmid-Isolation (Birnboim and Doly, 1979)

Die Bakterien (*E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*) wurden in LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Jeweils 2 ml jeder Bakterienkultur wurden abzentrifugiert, das Pellet in 100 ml Lösung 1 gelöst und anschließend mit 200 µl Lösung 2 und 150 µl Lösung 3 behandelt. Nach 15 min auf Eis wurde die Probe mit 1 VT PCI gefällt. Die obere Phase wurde dann mit 2 VT 96 % Ethanol auf Eis für 30 min gefällt. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl 0,1 x TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium:	10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
Lösung 1:	25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 50 mM Glucose
Lösung 2:	1 % (w/v) SDS 0,2 M NaOH
Lösung 3:	3 M KCH ₃ COO, pH 4,8
PCI:	25 VT Phenol 24 VT Chloroform 1 VT Isoamylalkohol
0,1x TE:	10 mM Tris HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA

Aufreinigung von DNA- und PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Extract II PCR clean-up and gel extraction (Macherey-Nagel) nach beiliegendem Protokoll.

2.2.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 2,5 µg RNA eingesetzt und die Synthese nach dem Protokoll des RevertAid H Minus cDNA synthesis kit (MBI Fermentas) durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung, der Reinheitsüberprüfung und Fragment-Größenbestimmung von DNA und RNA. Die Gele bestanden aus 1 % Agarose in 1x TAE und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Agarose wurde im TAE-Puffer geschmolzen, nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt und je nach Probenanzahl in verschieden große Gelkammern gegossen. Vor dem Probenauftrag wurde jede Probe 0,2 VT

„loading-dye“ vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-100 V in 1 x TAE-Puffer. Die DNA-Banden wurden am UV-Transilluminator sichtbar gemacht und photographiert.

50x TAE-Puffer: 2 mM Tris/Acetat, pH 8,3
 10 mM Na₂EDTA

“loading dye”: 10 mM Na₂PO₄, pH 7,0
 50 % (v/v) Glycerin
 0,4 % (w/v) Orange G

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll des Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) zusammengestellt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Programmierung des Gerätes richtete sich nach der Fragmentgröße, Amplifikatmenge und den verwendeten Primern.

Ein Standardprogramm für Amplifikate der Größe 500-1000 bp:

Denaturierung:	94 °C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	58 °C	1 min	
Elongation:	72 °C	1 min	
Elongation:	72 °C	4 min	

Die Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) ausgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Analyse-Software wie BioEdit oder NCBI (BLAST tools) überprüft.

2.2.6 Restriktionsanalysen

DNA-Restriktionen durch spezifische Restriktionsendonukleasen wurden nach folgendem Standardansatz zusammengestellt:

50-500 ng	Plasmid-DNA
2 µl	10 x Reaktionspuffer
0,5 µl	10 U/µl Restriktionsenzym
Σ 20 µl	H ₂ O

Der Restriktionsansatz inkubierte für 2 h bei 37 °C. Individuelle Ansätze und Doppelspaltungen wurden nach den Tabellen der Fermentas-Seite (www.fermentas.com) durchgeführt.

2.2.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit folgendem Standardansatz realisiert:

30 ng	Vektor-DNA
300 ng	Insert-DNA
1 µl	10x Ligasebuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
Σ 20 µl	H ₂ O

Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 1:50 betragen. Die Ligation inkubierte bei ca. 10 °C für 2-20 h im Kühlschrank. Für die *E. coli*-Transformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.8 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente 100 µl *E. coli*-Zellen (DH5α, BL21) auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5 µl Ligationsansatz oder 0,5 µl Plasmid-DNA vorsichtig in die Zellen gegeben, invertiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 90 sec ausgeführt und die transformierten Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurde 0,5 ml LB-Medium hinzugefügt und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C im Schüttelschrank (250 UpM) geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in LB-Medium überführt.

TM137 Zellen, 4mal mit sterilem 10%igem Glycerol gewaschen, wurden durch Elektroporation (Micropulser BioRAD) mit 0,5 µl Plasmid-DNA transformiert und ebenfalls auf LB-Agar-Platten (mit entsprechenden Antibiotika) selektiert.

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut (ca. 2 h) und mit 5 µl der Plasmid-DNA versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min auf Eis. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend einem Hitzeschock bei 37 °C für 5 min ausgesetzt. Nachdem 1 ml YEB-Medium dem Ansatz zugefügt wurde, schloss sich eine vierstündige Inkubation bei 28 °C im Schüttelschrank (200 U/min) an. Die Zellen wurden auf YEB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

YEB-Medium:	2 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	Pepton
	5 g/l	Saccharose
	5 g/l	Fleischextrakt

2.2.9 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte über den Agrobacterium-vermittelten Gentransfer nach der Blütentauchmethode („floral dip“) von Clough und Bent (Clough and Bent, 1998). Hierzu wurden die noch geschlossenen Blüten in eine Agrobacterium-Suspension (50 ml Agrobacterium-Übernachtskultur zentrifugiert, Sediment in 50 ml 5 % Saccharoselösung und 25 µl Silvet gelöst) getaucht. Die behandelten Pflanzen wurden mit einer Plastikhaube abgedeckt und weiter in den Klimaschränken kultiviert.

Nach dem Abreifen der Samen wurden diese getrocknet, sterilisiert und auf ½ MS-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgesät.

2.2.10 Metabolitmessungen

Aminosäurebestimmung

Für die Aminosäurebestimmung wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörkert und in 1,8 ml 80 % Ethanol für 30 min homogenisiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 20000 rpm) wurde der Überstand in der Speed vac vakuumgetrocknet und in 8 mM Na₂PO₄ (pH 6,8) und 0,4 % Tetrahydrofuran gelöst. Die individuellen Aminosäuren wurden nach Derivatisierung mit O-phthaldialdehyd, wie bei Eisenhut (Eisenhut et al., 2006) beschrieben, mittels HPLC quantifiziert.

Glyoxylat-Bestimmung

Glyoxylat wurde mit einer spezifischen Farbreaktion nachgewiesen (Brautigam et al., 2007). Das Prinzip der hier stattfindenden Reaktionen besteht darin, Carbonylgruppen, wie sie im Glyoxylat und in Zuckern vorkommen, mit Phenylhydrazin zu Phenylhydrazonen reagieren. Die Zuckerphenylhydrazone reagieren in schwach saurer Lösung (hier 100 mM HCl) mit überschüssigem Phenylhydrazin weiter zu in Wasser schwer löslichen Osazonen. Da Glyoxylat keine benachbarte Alkoholgruppe (Vorraussetzung für Osazon Bildung) besitzt, findet diese Reaktion nicht statt. Nach der ersten Zentrifugation sind somit die Osazone entfernt. Das Eisen des danach zugegebenen $K_3Fe[(CN)_6]$, wird von dem Glyoxylatphenylhydrazon von Fe_3^+ zu Fe_2^+ reduziert. Dies wird in einer rötlichen Färbung sichtbar und ist am Photometer bei 520 nm detektierbar. Die ausführliche Beschreibung der angewandten Methode ist in meiner Diplomarbeit (Ewald, 2005) nachzulesen.

2.2.11 Proteinisolation

Isolation pflanzlicher Blatt- und Wurzelproteine

In der Mitte der Lichtperiode wurde 100 mg Blattmaterial bzw. Wurzelmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Destroy-Stick in 200 μ l Aufschlusspuffer (Wurzelaufschluss erfolgte mit Mörser und Stößel) auf Eis homogenisiert. Die Proben wurden bei 4 °C für 10 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß bei -20 °C gelagert.

Aufschlusspuffer:	50 mM	HEPES, pH 7,6
	100mM	Sorbitol
	1 mM	EDTA
	10mM	NaCl
	5mM	MgCl ₂
	1 mM	PMSF
	1 mM	Pefablock

Isolation von Mitochondrienmatrix-Protein

Die Isolation von Blattmitochondrien erfolgte von ca. 50-100g Rosettenblättern (2 Monate alte Pflanzen) nach dem Protokoll von Keech (Keech et al., 2005). Die Mitochondrien wurden in einem Puffer, welcher 0,3 M Saccharose, 10 mM TES-KOH, pH 7.5, 10 mM KH_2PO_4 und 2 mM EDTA enthielt, resuspendiert. Zur Gewinnung der Matrixproteine wurden die Mitochondrien einem 4maligem Einfrier/Auftau-Zyklus unterzogen und bei 44000 g für 30 min zentrifugiert um die mitochondriale Membran abzutrennen.

Isolation von Chloroplastenstroma-Protein

Die Isolation von Chloroplasten (6 Wochen alte Pflanzen) erfolgte nach dem Protokoll von Salvi et al., 2008. Die gewaschenen *lip2p-2* Chloroplasten wurden 3mal aufgetaut und wieder eingefroren und zusätzlich 4mal für 15 sec. mit Ultraschall behandelt (Braun Labsonic U, 50 W, 4mal 15 sec) um die Membranen zu zerstören. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 20000 g (4 °C). Der Überstand wurde abgezogen und für Western Blot Analysen verwendet.

Isolation bakterieller Proteine

Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 g, 4 °C) pelletiert und in vorgekühlten 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,8) bei 4 °C resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (Braun Labsonic U, 50 W, 4mal 15 sec). Durch eine Zentrifugation bei 20000 g für 30 min bei 4 °C wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen separiert und eingefroren (-80 °C).

2.2.12 Atmungsmessung und PDH/ KGDH-Aktivität von isolierten Mitochondrien

Die Durchführung der Atmungsmessungen mit isolierten Mitochondrien bzw. die Aktivitätsmessung der Pyruvat-Dehydrogenase oder α -Ketoglutarat-Dehydrogenase dieser Mitochondrien ist ausführlich nachzulesen bei Ewald (Ewald et al., 2007).

2.2.13 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie® brilliant blue G-250“ oder „Serva®-Blue G“ an Proteine in saurer Lösung. Der entstehende Komplex besitzt einen höheren Extinktionskoeffizienten als der freie Farbstoff. Die Färbelösung wurde 1:5 mit H₂O verdünnt. In Einwegküvetten wurden 990 μ l der verdünnten Färbelösung und 10 μ l des Proteinextraktes gegeben, gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion bei 595 nm wurde an einem Photometer (Cary Win UV 50) gegen den Blindwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichreihe aus BSA (0 - 15 μ g) ermittelt.

2.2.14 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE (SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese) zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch 12 % (w/v) Tricine-SDS-PAGE (Schagger,

2006), bzw. mit 12 % Glycin-SDS Gelen nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit dem jeweiligen Ladepuffer versetzt, bei 95 °C 10 min gekocht und bis zum Gelauftrag bei 4 °C gelagert. Pro Tasche wurden 5 bis 20 µg Proteinextrakt aufgetragen. Die Proteingele wurden entweder mit Coomassie gefärbt oder zur immunologischen Detektion auf Nitrozellulosemembran bzw. Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) geblottet. Der immunologische Nachweis erfolgte nach Standardprotokollen entweder über Chemilumineszens Detektion (Anti rabbit IgG-Peroxidase) oder durch Farbreaktion mit NBT/BCIP Lösung (Alkalische Phosphatase). Nach Chemilumineszens Detektion konnte die Membran mit *stripping buffer* (47 mM Tris-HCl pH-6,7, 2 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) für 2 Stunden bei 50 °C gewaschen werden und erneut zur immunologischen Detektion verwendet werden.

Die verwendeten Antikörper (Tabelle 7.4) wurden käuflich erworben, stammen aus früheren Arbeiten oder wurden in dieser Arbeit angefertigt. Hierzu wurde gereinigtes rekombinantes Protein zur Standard-Immunisation (zwei Monate) in Kaninchen (*rabbit*) zur Herstellung eines Antikörpers zur Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) geschickt. Das Serum der finalen Blutung wurde direkt eingesetzt bzw. weiter aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von Nitrozellulosemembran, auf die das jeweilige rekombinante Protein geblottet wurde. Die Membran wurde über Nacht mit Serum (1:8 in TBS) inkubiert, nach Waschen wurde der gebundene Antikörper schonend mit 100 mM Glycin (pH-Wert 2,9) für 20 min von der Membran eluiert und durch Zusatz von Tris-Puffer (1 M, pH-Wert 8,0) neutralisiert. Der gereinigte Antikörper wurde mit BSA als Zusatz bei -20 °C gelagert (Protokoll: „Affinity Purification of Antibodies Using Proteins Bound to Nitrocellulose by Michael Koelle, adapted from Will Talbot & Frank Solomon's lab, 1/98“, <http://biowww.net/detail-1131.html>).

2.2.15 Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

Zur Aufreinigung von Step-getaggten bzw. Histidin-getaggten Proteinen wurden die Zellkulturen (200 ml bis 1 l) bei einer OD (600 nm) von ca. 0,6 induziert (pBAD-HisA 0,2 % Arabinose, pASK-IBA7plus 200 µg/l Anhydrotetracyclin) und bei 20 °C für 10 h bei 200 U/min geschüttelt. Die Lysate wurden für die Affinitätschromatographie verwendet, die nach dem Protokoll „Protocol for purification of Histagged proteins under native conditions“ (Invitrogen) bzw. nach dem Protokoll der Firma IBA BioTAGnology „Expression and purification of proteins using Step-tag and/or 6xHis-tag“ durchgeführt wurde. Zur Überprüfung der Elutionen wurde eine SDS-PAGE angefertigt.

Aufgereinigte Proteine für Enzymmessungen wurden zusätzlich mittels pD-10 Säulchen (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany) umgepuffert (10 mM Tris/10 mM Mops (pH-Wert 7,5), 0,5 mM MgSO₄ und 5 mM 2-Mercaptoethanol) um störende Salze zu entfernen.

Weiterhin wurden die Proteine über VivaSpinTM Säulchen mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa (Sartorius, Göttingen, Germany) eingeeengt.

2.2.16 Wachstumsanalysen von TM137 Zellen

Für die Wachstumsanalysen von *E. coli* Stämmen (TM137 untransformiert und/oder transformiert) wurden die Zellen zuerst in 5 ml M9-Medium (Na_2HPO_4 34 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 8,5 mM, NH_4Cl 19 mM, MgSO_4 2 mM, CaCl 0,1 mM, Thiamin 0,001 %) unter Zugabe von 0,2 % Glucose (G), 5 mM Natrium-Acetat (A), 5 mM Natrium-Succinate (S), 100 µg/mL Kanamycin, 2 µg/mL Tetracyclin angezogen. Bei TM137 Zellen, die mit pASK-IBA7plus bzw. pBAD-His-A transformiert waren, enthielt das Medium zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin. Bei Erreichen einer OD (600 nm) von 0,1 wurde 1 ml von jedem Stamm in 100 ml M9-Medium (200 µg/l Anhydrotetracyclin bei pASK-IBA7plus bzw. 0,2 % Arabinose bei pBAD-His-A) mit den jeweiligen Antibiotika gegeben. Die Messung der OD (600nm) erfolgte alle 2 Stunden am Photometer. Bei Komplementationsversuchen mit AtLPLA enthielt das Medium zusätzlich 500 ng/ml DL- α -lipoic acid, Durchführung analog zu Kang (Kang et al., 2007).

Für die Komplementation auf Agar-Platten wurde dem M9-Medium 1,5 % Agar zugesetzt.

2.2.17 *In vitro* Lipoylierung von mitochondrialen Proteinen

Für die *in vitro* Lipoylierung von Wildtyp Mitochondrien wurden 5 µg mitochondriales Matrix-Protein mit 1 µg rekombinanter gereinigter *E. coli* LPLA (Hasse et al., 2009) für 16 h in einem Puffer, welcher 100 mM MOPS and 100 mM Tris, pH-Wert 7,5, 50 mM MgCl_2 , 5 mM ATP und 400 µM DL- α -lipoic acid enthielt, inkubiert. 5 µg von unbehandeltem bzw. mit EcLPLA versetztem Matrix-Protein wurden für Western Blot Analysen eingesetzt.

2.2.18 Expression von pflanzlichen bzw. bakteriellen Proteinen in *E. coli*

Die cds der pflanzlichen bzw. bakteriellen Proteine wurde mittels PCR (Template Blatt cDNA bei pflanzlichen Proteinen, bakterielle DNA bei bakteriellen Proteinen) mit verschiedenen Primerkombinationen, welche Restriktionsschnittstellen für verschiedene Expressionvektoren enthielten amplifiziert (Tabelle 7.3). Die erhaltenen Amplifikate wurde nach Aufreinigung (2.2.1) in den Klonierungsvektor pGEM-T kloniert, womit wiederum *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert wurden (2.2.8). Positive Klone wurden nach Plasmid-Isolation (2.2.1) mittels Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (2.2.6) selektiert. Danach wurden die restrigierten Fragmente nach Aufreinigung in die zuvor geschnittenen Expressionsvektoren ligiert (2.2.7) womit BL21 Zellen transformiert wurden. Positive Klone

wurden wiederum durch Kontrollrestriktion selektiert. Die Zellen der positiven Klone wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen mit einem Drittel Glycerol (v/v) versetzt und bei -80 °C gelagert. Die Proteine wurden wie in 2.2.11 beschrieben in *E. coli* Zellen exprimiert und aufgereinigt.

2.2.19 Herstellung chimärer LPLA-Proteine

Die cds der AtLPLA und der LPLA aus Reis (OsLPLA) wurden mit Primern, in denen eine BamHI-Schnittstelle und eine HindIII-Schnittstelle enthalten waren, ohne Stopcodon amplifiziert. Die restrigierten Fragmente (Abbildung 2.1 B) wurden in den Vektor pASK-IBA7plus kloniert. Die Vektoren, welche die LPLA cds enthielten, wurden mit HindIII geschnitten. Die C-terminale Dömanne der EcLPLA (AAA21740) wurde mit Primern amplifiziert, welche jeweils eine HindIII-Schnittstelle enthielten und das Amplifikat einer Restriktion mit HindIII unterzogen (Abbildung 2.1 A). Die cds der CTD wurde in die pASK-IBA7plus/LPLA Vektoren über die HindIII-Schnittstelle kloniert.

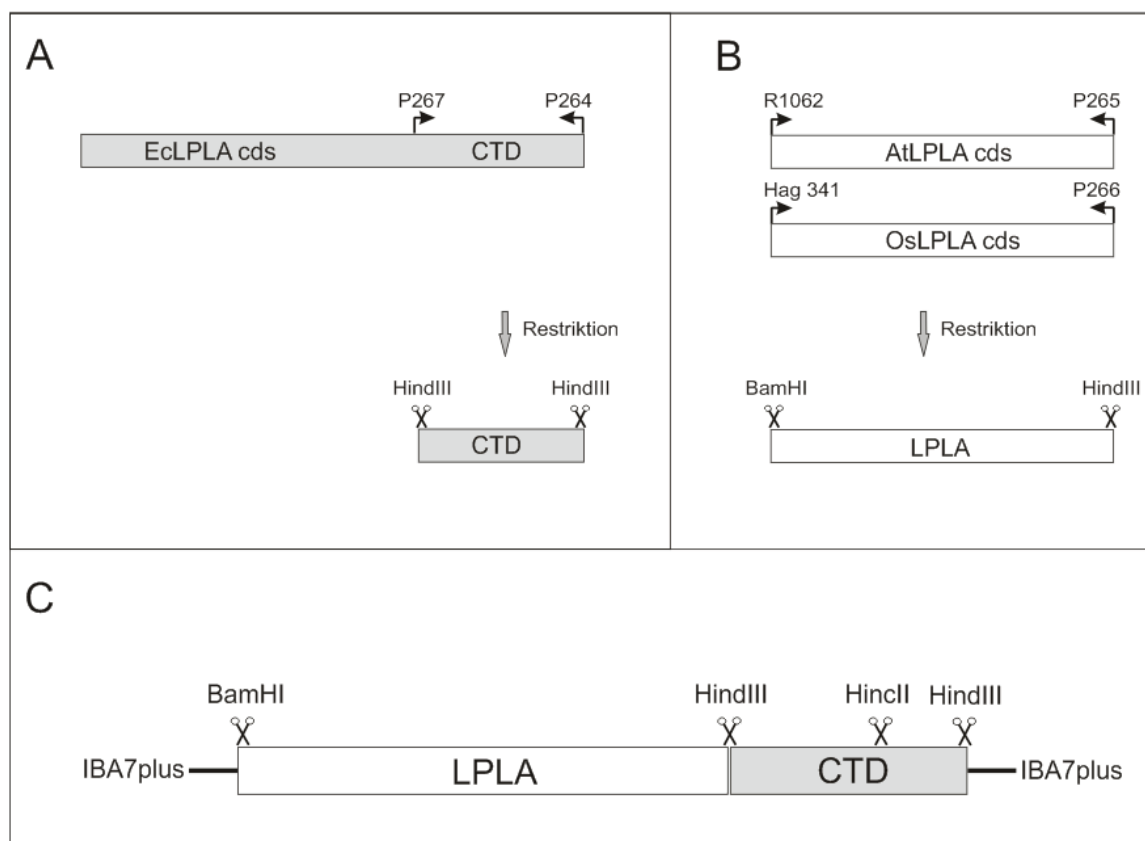


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Klonierung der LPLA-CTP chimären cds-Sequenzen in den Vektor pASK-IBA7plus

Da die Klonierung über eine ungerichtete Ligation erfolgte, wurden die erwünschten Klone (sense Orientierung der CTD) durch Kontrollrestriktionen mit der Enzymkombination BamHI/HincII ermittelt (Abbildung 2.1 C, Abbildung 2.2). Weil HincII im hinteren Drittel der CTD Sequenz schnitt, enthielten positive Klone längere BamHI/HincII Fragmente.

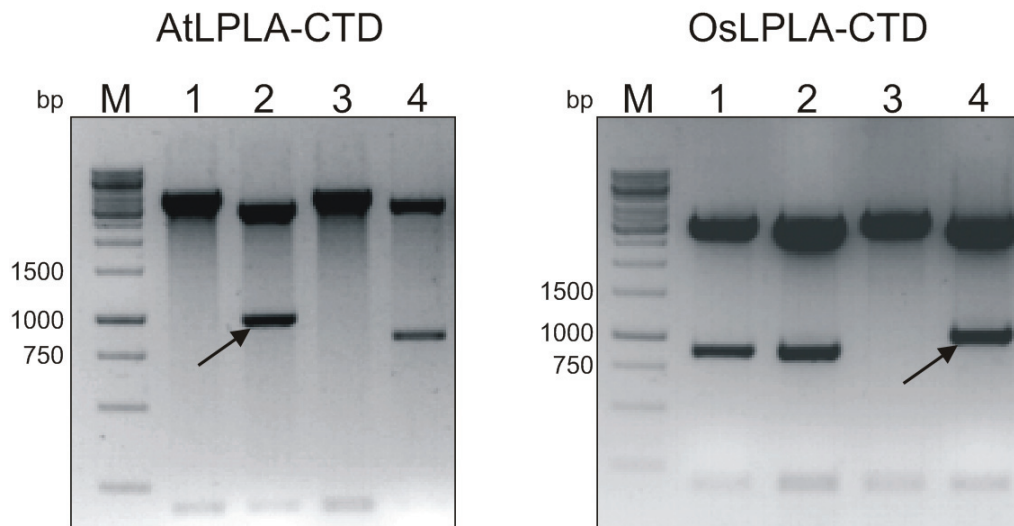


Abbildung 2.2 Kontrollrestriktion von pASK-IBA7plus/LPLA Plasmiden mit BamHI und HincII zur Überprüfung der Richtung der CTP Sequenz.

Die restrigierten Plasmide verschiedener Klone (1-4) wurden im Agarosegel aufgetrennt. Bei pASK-IBA7plus/AtLPLA-CTD Plasmiden in denen die CTD-Sequenz in sense Orientierung kloniert wurde, betrug die Fragmentgröße 979 bp (linker Pfeil). Die Fragmentgröße mit CTD in antisense Orientierung betrug 857 bp. Bei pASK-IBA7plus/OsLPLA-CTD Plasmiden mit CTD in sense Orientierung lag die erwartete Fragmentgröße bei 1003 bp (rechter Pfeil), hingegen betrug die Fragmentgröße mit CTD in antisense Orientierung 881 bp.

2.2.20 LPLA-Aktivitätsmessung mit ^{14}C -Octanoat

Die LPLA-Aktivität wurde in einem LPLA-Reaktionsansatz von 100 μl gemessen, welcher 10 mM Tris/10 mM Mops (pH 7.5), 5 mM MgSO_4 , 5 mM ATP, 0,4 mM DTT, 0,19 mM $[1-^{14}\text{C}]$ octanoic acid (0,1 mCi/ml, 55 mCi/mmol Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verschieden bakterielle und pflanzliche Apoproteine und variierende Mengen heterolog exprimierter und aufgereinigter AtLPLA enthielt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Ansatz mit 2,5 μg *E. coli* LPLA mitgeführt. In der Negativ-Kontrolle wurde kein Enzym hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 12 h bei 25 °C inkubiert und durch 10-minütiges Kochen abgestoppt. 20 μl des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden mittels eines 12%igen Tricin-SDS-Gels aufgetrennt und die ^{14}C -markierten Apoproteine mit Hilfe eines Phosphorimagers bzw. durch das Auflegen eines ECL-Films (mind. 2 Tage) detektiert.

Herstellung von Apoproteinen

Verschiedene Apoproteine (unlipoylierte Proteine) dienten als Substrat für die LPLA-Aktivitätsmessung. Für die Gewinnung von bakteriellen Apoproteinen wurden TM137 Zellen in M9-Medium (2.2.16) angezogen und lösliches TM137 Proteinlysate extrahiert (2.2.11).

Als pflanzliche Apoproteine wurde entweder *mtkas-2* Mitochondrienextrakt (2.2.11) genutzt oder es wurden pflanzliche Proteine in TM137-Zellen heterolog exprimiert. Die kodierenden Sequenzen der KGDH E2-Untereinheit (At5g55070, Primerkombination P220/P221 BamHI/HindIII Schnittstellen) und des H-Proteins (AtGLDH1 At2g35370, Primerkombination P213/P214 BamHI/SalI Schnittstellen) wurden mittels PCR (Col-0 Blatt cDNA als Template) amplifiziert und nach Restriktion über die eingefügten Schnittstellen in den Vektor pASK-IBA7plus kloniert. Die Vektoren wurden mittels Elektroporation in TM137 Zellen transformiert (2.2.8) und positive Klone auf LB-Platten mit den Antibiotika Kanamycin, Tetracyclin und Ampicillin selektiert. Die Klone wurden durch Kontrollrestriktion der isolierten Miniplasmide mit den entsprechenden Enzymen überprüft. Die transformierten TM137 Klone wurden für die heterologe Expression verwendet. Hierfür wurden die Zellen als erstes in einem Liter LB-Medium mit 5 mM Natrium-Acetat (A), 5 mM Natrium-Succinate (S) und den entsprechenden Antibiotika (100 µg/mL Kanamycin, 2 µg/mL Tet, 100 µg/mL Amp) bis zur maximalen optischen Dichte bei 600 nm von ca. 0,4 angezogen. Danach wurde ein weiterer Liter LB-Medium (A, S, Kan, Tet, Amp) hinzugegeben und die Expression durch Induktion mit Anhydrotetracyclin (200 µg/l) eingeleitet. Die Kulturen wurden bei 200 rpm für 12-16 h geschüttelt und Proteine, wie unter 2.2.15 beschrieben, isoliert und aufgereinigt.

2.2.21 Herstellung von LIP2- und AtLPLA-RNAi-Pflanzen

Ein 312 bp großes PCR Amplifikat des LIP2-Gens (Position 533 bis 844 flankiert durch *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen) wurde unter Verwendung der Primerkombinationen LIP2-RNAi-BamHI-5 (P129) und LIP2-RNAi-SalI-3 (P130) hergestellt und in Sense-Orientierung vor ein GA20 Oxidase Intron in den pUC-RNAi-Vektor (Chen et al., 2003) kloniert. Das gleiche Fragment wurde in Antisense-Orientierung hinter das GA20 Oxidase Intron (*Xho*I und *Bgl*II Schnittstellen P132/P131) in den pUC-RNAi-Vektor, welcher bereits das Sense-Stück enthielt, ligiert. Die gesamte RNAi-Kassette (*sense-loop-antisense*) wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Pst*I herausgeschnitten und in den Vektor pGREEN0029 kloniert, um neue Schnittstellen (*Xba*I und *Hind*III) für die Klonierung in die 35S-CaMV Kassette von pGREEN (<http://www.pgreen.ac.uk>) zu erhalten. Die gesamte 35S-CaMV Kassette, welche die RNAi-Kassette enthielt, wurde mittels der Primerkombination R1069/R1070 (*Not*I Schnittstellen) amplifiziert und in die *Not*I Schnittstelle des Pflanzentransformationsvektors pGREEN0179 zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101psoup) eingefügt. Die rekombinanten *Agrobacterium* Zellen wurden für die Transformation von

Arabidopsis Col-0 Wildtyppflanzen verwendet. Die Samen wurden auf Hygromycin-Platten (20 µg/ml) selektiert.

Analog zu dieser Methode wurden AtLPLA-RNAi-Pflanzen erzeugt. Die Primerkombination für das Sense-Stück war R1062/P223, für das Fragment in Antisense-Orientierung P222/P224.

2.2.22 Transiente Expression von LIP2p2-GFP-Fusionskonstrukten

Die ersten 246 bp der cds von LIP2p2, welche die ersten 82 N-terminalen Aminosäuren codieren, wurden mit Hilfe der Primerkombination P439 und P440 via PCR amplifiziert. Über die eingefügten Restriktionsschnittstellen XbaI und XhoI wurde die cds in den Vektor pGFP2 für die transiente Transformation von Tabakprotoplasten kloniert.

Die Protoplasten wurden aus steril angezogenen Tabakpflanzen isoliert (Wendt et al., 2000) und mit Plasmid-DNA (30 µg pro $0,5 \times 10^6$ Zellen) transformiert. Nach 18 stündiger Inkubationszeit bei Dunkelheit und Raumtemperatur wurde das Vorkommen grüner Fluoreszenz in den Protoplasten überprüft. Hierzu wurde ein Leica TCS SP5 Konfokales Mikroskopie System (Leica, Mannheim, Germany) verwendet. Das GFP wurde mit einer 488 nm *argon laser line* excitiert (15 % Illumination) und die Emission für GFP bei 505-540 nm, für die Autofluoreszenz bei 650-690 nm, durch ein 63x Wasserobjektiv detektiert. Die Leica *application suite* (LAS AF) *confocal imaging software* (Leica) wurde verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die EMS-Mutante *mtkas-1* hat einen Defekt in der mitochondrialen β -Ketoacyl-[ACP] Synthase (mtKAS)

3.1.1 Der photorespiratorische Phänotyp der Mutante *gld1* (*mtkas-1*) beruht auf einer Punktmutation im mtKAS-Gen

Durch Voruntersuchungen, mit dem Ziel, die durch EMS-Mutagenese verursachte Mutation der *gld1* (*mtkas-1*) Mutante (Somerville and Ogren, 1982) genau zu lokalisieren, konnte unsere Arbeitsgruppe eine Punktmutation im Gen At2g04540 (Austausch von G→A am Ende des 7. Introns, siehe Einleitung 1.2.3) detektieren. Ausschlaggebend für die Sequenzierung und den Vergleich des Gens At2g04540 zwischen *gld1* und Col-0 Wildtyppflanzen war der Befund, dass die T-DNA-Insertionsmutante SALK_022295 (*mtkas-2*) ein ähnliches Erscheinungsbild wie *gld1*-Pflanzen zeigte.

Das Ziel der weiteren Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob diese Punktmutation definitiv für den ausgeprägten photorespiratorischen Phänotyp der *gld1* Mutante verantwortlich war und warum eine solche Mutation zu jenem veränderten Erscheinungsbild der Pflanze führt.

Für eine zuverlässige vergleichende Analyse zwischen der EMS-Mutante *gld1* und T-DNA-Insertionsmutanten des Gens At2g04540 wurde eine weitere, verfügbare T-DNA-Insertionsmutante desselben Gens (SALK 087186; *mtkas-3*) bestellt. Die Mutanten wurden unter gleichen Bedingungen sowohl in normaler Luft als auch unter Hoch-CO₂ (0,14 % CO₂) angezogen und das Erscheinungsbild dokumentiert. Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, weisen alle drei Mutanten ein vergleichbares Wachstum auf. Bei Anzucht unter Normal-Luft Bedingungen wachsen die Mutanten langsamer als Wildtyppflanzen und ihre Blätter sehen hellgrüner aus (chlorotisches Erscheinungsbild). Bei Anzucht unter Bedingungen unterdrückter Photorespiration (erhöhter CO₂-Gehalt) sind hingegen keine signifikanten Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten.

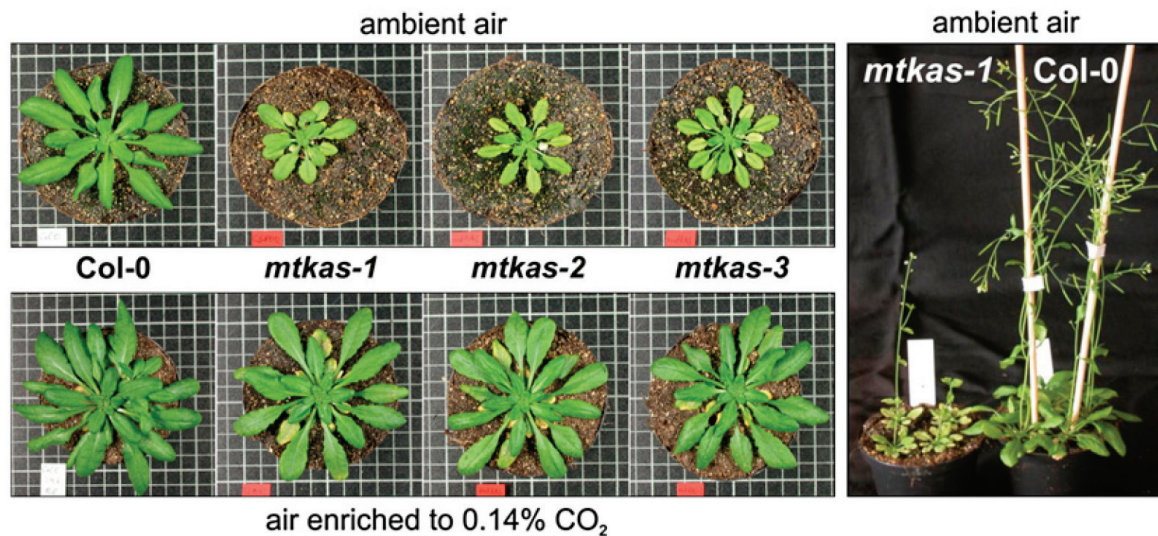


Abbildung 3.1 Wachstum von *mtkas-1* und zwei T-DNA-Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Die Pflanzen wurden 50 Tage unter Normal-Luft (links oben) bzw. erhöhten CO₂-Bedingungen (0,14 % CO₂, links unten) angezogen.

Der Nachweis der Homozygotie der T-DNA in den Linien *mtkas-2* und *mtkas-3* erfolgte nach Isolation genomischer DNA mittels PCR. Hierzu wurde ein Primer für die *left border* der T-DNA und Primer, die im mtKAS-Gen binden, benutzt. In beiden Linien konnte die T-DNA im mtKAS-Gen an vorhergesagter Stelle nachgewiesen werden. Durch das Fehlen der Amplifikate bei Verwendung von genspezifischen Primern (T-DNA flankierend) wurde gezeigt, dass kein wildtypisches mtKAS-Allel in diesen Linien vorlag (Abbildung 3.2). Der Knock-out der mtKAS-Transkripte in den T-DNA-Insertionsmutanten konnte durch RT-PCR bestätigt werden. Im Vergleich zu den T-DNA-Insertionsmutanten *mtkas-2* und *mtkas-3* konnten mtKAS-Transkripte in der EMS-Mutante *mtkas-1* und im Wildtyp nachgewiesen werden. Durch den Basenaustausch in der *mtkas-1* Mutante kommt es demzufolge nicht zu einem Abbruch der Transkription des mtKAS-Gens. Der Austausch von G zu A am Ende des 7. Introns führt zu einer Veränderung der Erkennungssequenz für *Splicing*-Enzyme. Die Vermutung liegt nahe, dass hierdurch das 7. Intron nicht herausgeschnitten wird, wodurch es zu einer Veränderung des Leserahmens kommt. Dies wiederum führt zu einem Abbruch der Translation durch ein neu entstandenes Stop-Codon (Abbildung 1.3), wodurch ein verkürztes defektes Protein entsteht.

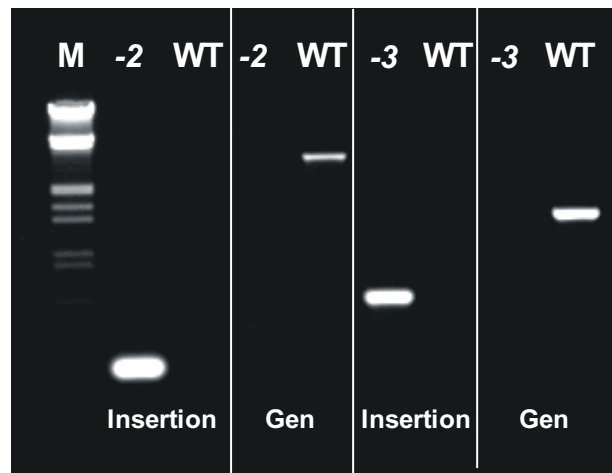


Abbildung 3.2 Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion in *mtkas-2* und *mtkas-3*

Für den Nachweis der T-DNA wurden die Primerkombinationen R758/R175 für *mtkas-2* (-2) und R833/R175 für *mtkas-3* (-3) verwendet. Der Nachweis des wildtypischen mtKAS-Allels erfolgte mit T-DNA flankierenden Gen-Primern, R758/R726 für *mtkas-2* und R833/R795 für *mtkas-3*. Isolierte DNA von Col-0 Pflanzen diente als Kontrolle (WT).

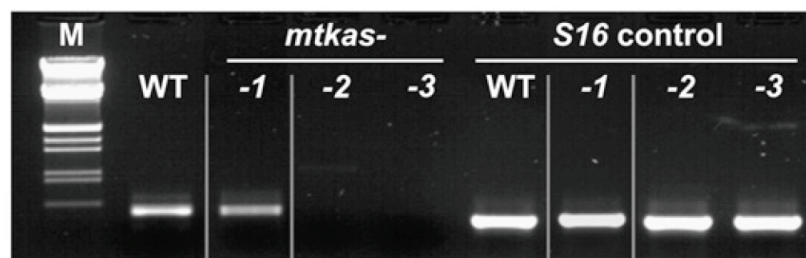


Abbildung 3.3 RT-PCR zum Nachweis der Transkriptgehalte in Blättern von mtKAS-Mutanten

Für den Nachweis der mtKAS-Transkriptmenge in den Mutanten *mtkas-1* (-1), *mtkas-2* (-2) und *mtkas-3* (-3) wurde die Primerkombination R795/R758 verwendet. Col-0 Blatt cDNA diente als Kontrolle. Die Gehalte der mRNA des 40S ribosomalen S16-Proteins dienen als Kalibrierung (Primerkombination R176/R177).

Zum endgültigem Beweis, dass allein die Punktmutation im mtKAS-Gen zu dem detektierten Phänotyp der EMS-Mutante *mtkas-1* führt, wurden Kreuzungsexperimente mit den beiden T-DNA Insertionsmutanten durchgeführt. Da laut der Mendelschen Uniformitätsregel die Nachkommen zweier Eltern uniform sind, d. h. ein Allel von jedem Elternteil besitzen, beinhalten Pflanzen der F1-Generation sowohl ein mtKAS-Allel mit einer T-DNA und ein Allel mit der Punktmutation. Aufgrund der Tatsache, dass diese Pflanzen das gleiche Erscheinungsbild wie die Elternpflanzen hatten, konnte gezeigt werden, dass die detektierte Punktmutation im mtKAS-Gen die Ursache für den photorespiratorischen Phänotyp ist. Zur

Kontrolle der erfolgreichen Kreuzung wurde per PCR die Heterozygotie der T-DNA-Insertion bestätigt

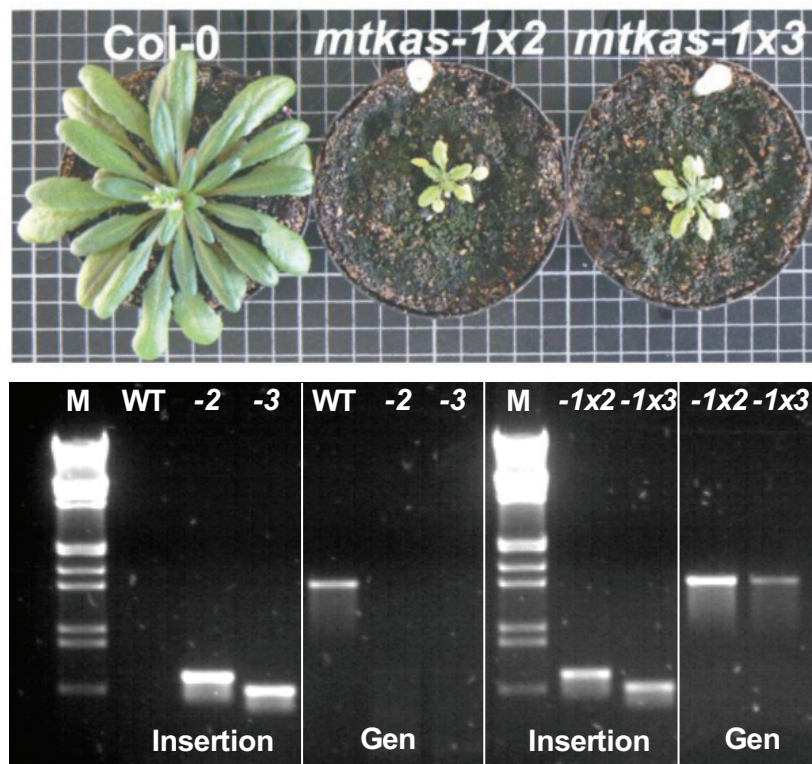


Abbildung 3.4 F1-Generation von Kreuzungen der *gld1* Mutante (*mtkas-1*) mit T-DNA Knock-out Linien *mtkas-2* oder *mtkas-3*.

Die obere Abbildung zeigt F1-Hybride sowie den korrespondierenden Wildtyp, angezogen unter Normal-Luft. Die Zygotie der T-DNA wurde durch PCR mit genomischer DNA überprüft (untere Abbildung). Hierfür wurden zum Nachweis der T-DNA die Primer R833/R175, zum Nachweis des wildtypischen Allels die Primer R833/R795 verwendet.

3.1.2 Aminosäuregehalte in mtKAS-Mutanten bekräftigen eine Störung im C₂-Zyklus

Für vergleichende Analysen der löslichen steady-state Aminosäuregehalte wurden die mtKAS-Mutanten sowie Wildtyppflanzen unter photorespiratorischen Bedingungen (Normal-Luft angezogen und Proben über einen Zeitraum von 24 Stunden (6:00, 13:00, 18:00 und 24:00 Uhr) genommen. Im Vergleich zum Wildtyp stiegen die Glycingehalte im Laufe der Lichtperiode auf das 40-50fache an und sanken im Laufe der Dunkelphase auf das 20-30fache ab. Die Gehalte der Aminosäuren Serin, Glutamin, Glutamat und Alanin wiederum veränderten sich in gegenläufiger Richtung, d. h. sie waren im Gegensatz zum Wildtyp in der Dunkelphase signifikant erhöht und sanken während der Lichtperiode auf bzw. unter Wildtyp-Niveau (Abbildung 3.5). Die Gehalte anderer Aminosäuren waren nicht bzw. nur moderat verändert (Daten nicht gezeigt).

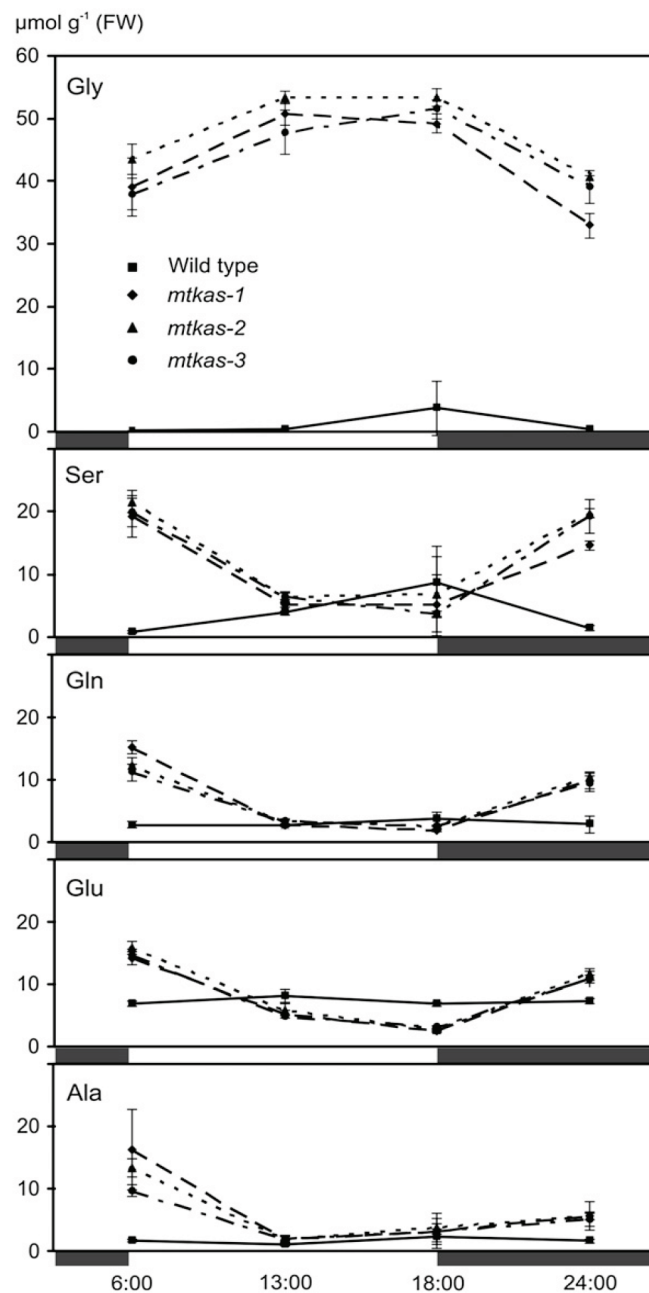


Abbildung 3.5 Tageszeitliche Aminosäuregehalte der mtkAS-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Die veränderten Aminosäuregehalte weisen auf eine drastische Störung des photorespiratorischen Stoffwechselweges in mtkAS-Mutanten hin. Die Lichtperiode ist durch weiße, die Dunkelperiode durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von Wildtyp (Quadrat), *mtkas-1* (Rhombus), *mtkas-2* (Dreieck) und *mtkas-3* (Kreis) stammen von drei unabhängigen Proben.

3.1.3 In *mtkas*-Pflanzen kommt es zu einem Anstau von Glyoxylat

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es in Pflanzen mit Defekten der photorespiratorischen Enzyme GDC bzw. SHM neben dem signifikanten

Anstau von Glycin auch zu einem Rückstau von Glyoxylat, der Vorstufe von Glycin im C₂-Zyklus, kommt (Ewald, 2005; Eisenhut et al., 2007). Die Messungen der Gehalte von Glyoxylat in Blättern von *mtKAS*-Mutanten, ergab ebenfalls signifikant erhöhte Glyoxylatmengen (ca. 3fach im Vergleich zum WT), wodurch eine weitere Bestätigung für einen Defekt in einem photorespiratorischen Enzym in den *mtkas*-Pflanzen erbracht wurde.

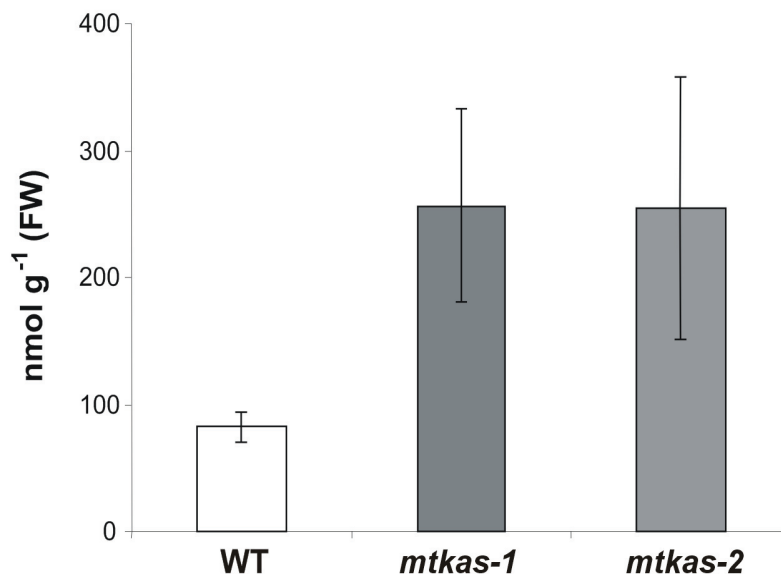


Abbildung 3.6 Anstau von Glyoxylat in den Rosettenblättern von *mtkas*-Pflanzen

3.1.4 *mtkas*-Mitochondrien weisen sehr geringe Decarboxylierung von Glycin auf

Zur näheren Untersuchung der Effekte, die durch den Knock-out der *mtKAS* verursacht werden, wurden Mitochondrien aus Rosettenblättern isoliert und die Decarboxilierung von Glycin mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode vermessen. Durch den Umsatz von Malat und NADH, sowie normale Kopplungsraten der Mitochondrien (Keech et al., 2005) konnte die Intaktheit der Mitochondrien bestätigt werden. In Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen der *mtkas-1* Mutante von Somerville (Somerville and Ogren, 1982) konnte gezeigt werden, dass der Umsatz von Malat in *mtkas*-Mitochondrien kaum von Wildtyp Mitochondrien abweicht. Im Gegensatz dazu lag der gemessene Umsatz von Glycin bei nur ca. 5 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.7).

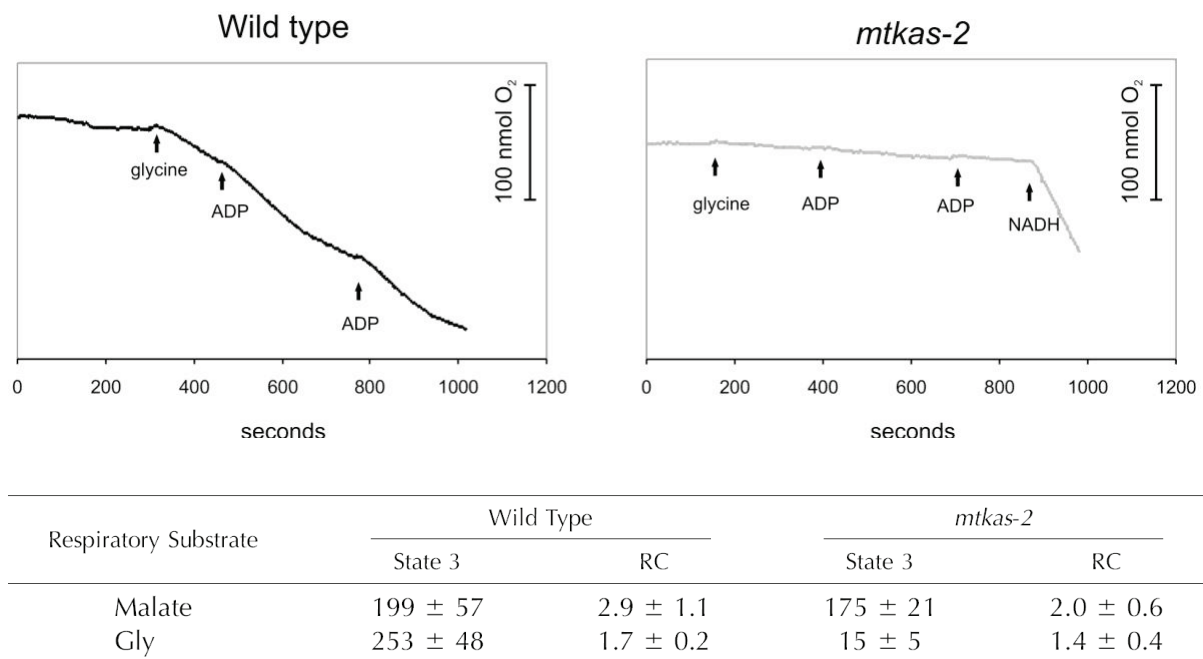


Abbildung 3.7 Atmungsdaten von *mtkas-2* Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp

Isolierte *mtkas-2* Mitochondrien weisen nur ca. 5 % der gemessenen Wildtyp Glycinderboxylierung auf (oben: exemplarische Messkurven). Der Umsatz von Malat hingegen ist kaum betroffen (untere Tabelle). Die Atmungsdaten (je zwei unabhängige Mitochondrienisolationen mit jeweils 2-3 Messungen) wurden nach der Zugabe von ADP (state 3) bestimmt und sind als O_2 -Abnahme [$nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}\ Protein$] dargestellt. Die Atmungskontrollwerte (*respiration control* = RC) stellen den Quotienten aus den Werten von state 3 und state 4 dar. Die Zugabe von NADH (oben, rechts) diente als Kontrolle für atmungsaktive Mitochondrien. Analoge Messungen mit *mtkas-1* Mitochondrien ergaben vergleichbare Werte.

Die Befunde der Atmungsmessungen belegen, dass ein Fehlen der mtKAS zu einem Defekt der GDC führt, wodurch es Mitochondrien dieser Mutanten nicht mehr bzw. kaum möglich ist Glycin umzusetzen. Im Gegensatz dazu war der Umsatz von Substraten des Zitrat-Zyklus (Malat) nur geringfügig verringert.

3.1.5 *mtkas*-Mitochondrien haben reduzierte PDH und KGDH Aktivitäten

Ebenso wie das H-Protein der GDC benötigen auch die E2-Untereinheiten der Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase Liponsäure als prosthetische Gruppe. Aufgrund der Erkenntnis, dass die mtKAS die wichtige Vorstufe Octanoyl-ACP für die Lipoylierung von Apoproteinen liefert, wurde die Auswirkung auf die Aktivitäten der PDH und KGDH in *mtkas*-Mitochondrien untersucht. Atmungsmessungen mit isolierten Wildtyp Mitochondrien ergeben unter Verwendung der Substrate Pyruvat und α -Ketoglutarat nur sehr geringe Umsatzraten. Deswegen wurden die Aktivitäten der Enzyme mit lysierten Mitochondrien über den Umsatz von NAD^+ zu NADH gemessen (Schuller and Randall, 1989).

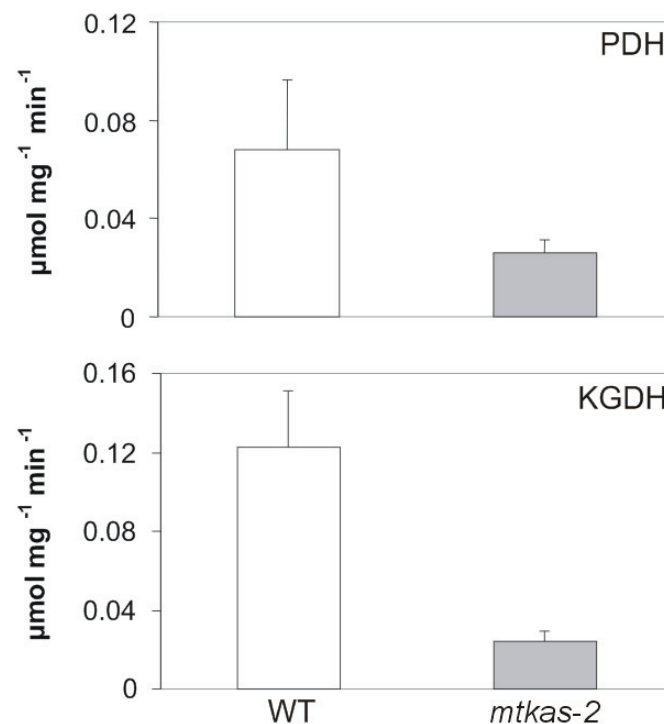


Abbildung 3.8 Aktivitäten der Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase in *mtkas-2* Mitochondrien bezogen auf Mitochondrienprotein

Die Aktivitätsmessungen dieser beiden Enzymkomplexe ergab, dass der Verlust der mtKAS zu einer signifikanten Verringerung der Umsätze von Pyruvat (*mtkas-2* $0,026 \pm 0,005$; WT $0,068 \pm 0,028$) sowie von α -Ketoglutarat (*mtkas-2* $0,024 \pm 0,008$; WT $0,125 \pm 0,024$) führt. Diese gemessenen Restaktivitäten lagen bei 40 % (PDH) und 20 % (KGDH) verglichen mit der gemessenen Enzymaktivität in Wildtyp Mitochondrien. Obwohl die restlichen Aktivitäten dieser Enzyme der mitochondrialen Atmung zwar eindeutig reduziert waren, lag ihre Restaktivität jedoch höher als der gemessene Glycin-Umsatz in *mtkas*-Mitochondrien. Diese Befunde deuten auf eine stärkere Beeinträchtigung des Lipoylierungsstatus des H-Proteins der GDC als der E2-Untereinheiten der PDH und KGDH-Enzymkomplexe durch den Ausfall der mtKAS hin.

3.1.6 Mitochondriale E2-Untereinheiten und das H-Protein weisen unterschiedlich starke Proteinlipoylierung in *mtkas* auf

Zur näheren Untersuchung der Auswirkungen des mtKAS Knock-out auf die mitochondriale Proteinlipoylierung der unterschiedlichen Apoproteine wurden Western Blot Analysen mit einem käuflich erworbenen Antikörper gegen Liponsäure angefertigt. Da proteingebundene Liponsäure mit dem Lipid-Peroxidationsprodukt 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) reagieren kann,

was zu einem Verlust der Antigenität der Proteindomäne führt und gezeigt wurde, dass das H-Protein hierfür anfälliger ist als die E2-Untereinheiten der PDH und KGDH (Millar and Leaver, 2000; Taylor et al., 2002), wurden die verwendeten Pflanzen unter erhöhten CO₂-Bedingungen angezogen. Hierdurch sollten diese Effekte so gering wie möglich gehalten werden. Zur Untersuchung des Gehaltes H-Protein gebundener Liponsäure wurden zuerst Western Blots mit löslichen Proteinextrakten von Blättern der 3 *mtKAS*-Mutanten und Wildtyppflanzen angefertigt.

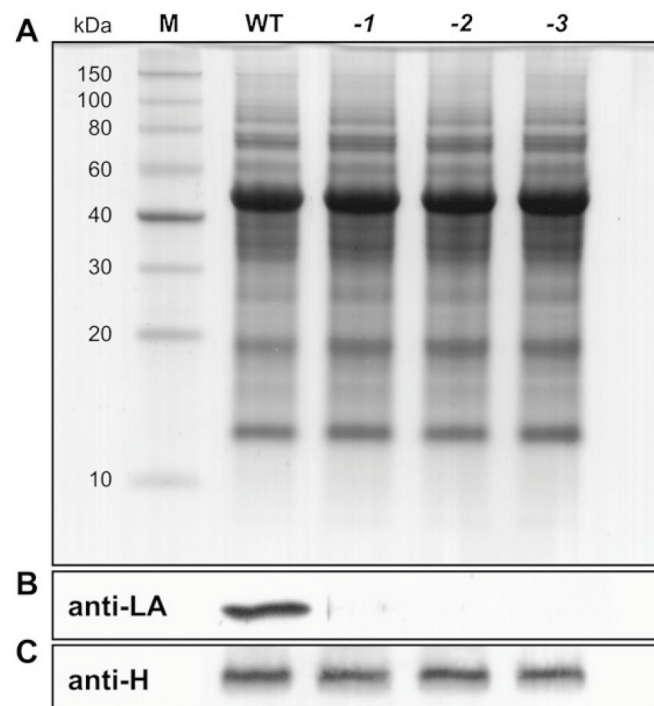


Abbildung 3.9 Die Lipoylierung des H-Proteins ist vorrangig abhängig von *mtKAS*-Biosyntheseweg

Nachweis äquivalenter Proteinmengen von *mtkas-1* (-1), *mtkas-2* (-2) und *mtkas-3* (-3) im Vergleich zum Wildtyp (WT) durch Coomassie gefärbtes Tricin-SDS-Gel (A). Das H-Protein scheint nahezu vollständig unlipoyliert in Blättern von *mtkas*-Pflanzen vorzuliegen; Western Blot zur Analyse proteingebundener Liponsäure mit Antiserum gegen LA (B). Der Gehalt des H-Apoproteins ist in den Mutanten nicht reduziert; Western Blot mit Antiserum gegen das H-Protein (C). In allen Spuren wurden 10 µg löslicher Proteinextrakt (Rosettenblatt) von unter Hoch-CO₂ angezogenen Pflanzen auf 12%ige SDS-Gele aufgetragen.

Die Western Blot Analysen zeigten, dass ähnliche Gehalte an H-Protein in den *mtkas*-Pflanzen und im Wildtyp vorlagen (Abbildung 3.9 C), was für einen normalen Umsatz des H-Apoproteins in den *mtkas*-Pflanzen sprach. Jedoch schienen die H-Proteine in den *mtkas*-Pflanzen gänzlich unlipoyliert vorzuliegen (Abbildung 3.9 B). Aus diesem Grund wurden die H-Protein Banden von Coomassie gefärbten Gelen mit Hilfe von MALDI-TOF MS (*matrix*-

assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) näher untersucht. In diesen Untersuchungen konnten Signale von lipoylierten H-Protein Peptiden im Wildtyp detektiert werden, fehlten aber bzw. lagen unterhalb der Nachweisgrenze bei den H-Proteinen der *mtKAS*-Mutanten (Ewald et al., 2007). Diese Befunde bewiesen ebenfalls, dass die H-Proteine in *mtkas* als Apoproteine vorlagen und nicht als HNE-modifizierte lipoylierte Peptide.

Das H-Protein der Glycin-Decarboxylase ist in Pflanzen mitochondrial lokalisiert, eine Pyruvat-Dehydrogenase kommt jedoch auch chloroplastidär vor. Deshalb wurden zur Untersuchung der Liponsäure-Gehalte der E2-Untereinheiten isolierte Mitochondrien verwendet. Die Untersuchung isolierter Mitochondrien bot weiterhin den Vorteil der Proteinanreicherung der H-Proteine, wodurch im Western Blot auch marginale Spuren von Liponsäure eher detektierbar waren. Durch starkes Überbelichten des Western Blots (Abbildung 3.10 B) wurde ersichtlich, dass die H-Proteine von *mtkas*-Pflanzen nicht vollständig unlipoyliert waren, sondern noch ca. 1 % Restlipoylierung vorhanden war (densitometrische Auswertung mit SIGMAGEL). Die detektierte Restlipoylierung stimmte mit den gemessenen minimalen Umsatzraten von *mtkas*-Mitochondrien mit Glycin überein.

Interessanterweise lag die Signalstärke von lipoylierten E2-Untereinheiten der PDH und KGDH (Identifizierung laut molekularer Masse und Laufverhalten; beschrieben bei Yasuno (Yasuno et al., 2004)) bei ca. 30 % verglichen mit den Signalstärken der WT-Mitochondrien Banden und somit deutlich höher als die des H-Proteins. Auch hier korrespondierten wiederum die Signalstärken (Liponsäure-Gehalte) mit den zuvor ermittelten Enzymaktivitäten beider Enzymkomplexe.

Ein analog angefertigter Blot mit Proteinextrakten aus Wurzeln hingegen zeigte keine signifikanten Veränderungen in den Signalstärken der E2-Untereinheiten zwischen *mtkas*- und Wildtyppflanzen (Abbildung 3.11), was für unterschiedliche organspezifische Auswirkungen des Knock-out der *mtKAS* sprach.

Um die Ursache der unterschiedlichen Gehalte von gebundener Liponsäure der einzelnen mitochondrialen Apoproteine (PDH, KGDH und H-Protein) in Blattmitochondrien und die Tatsache, dass der Knock-out der *mtKAS* zu keinerlei Veränderung im Lipoylierungsstatus von Wurzelproteinen führt, zu verstehen, zielten die weiterführenden Forschungen auf das Verständnis und die Aufklärung der Proteinlipoylierung in *Arabidopsis* hin. Welche Enzyme sind an der Proteinlipoylierung beteiligt und wie wirken sie zusammen?

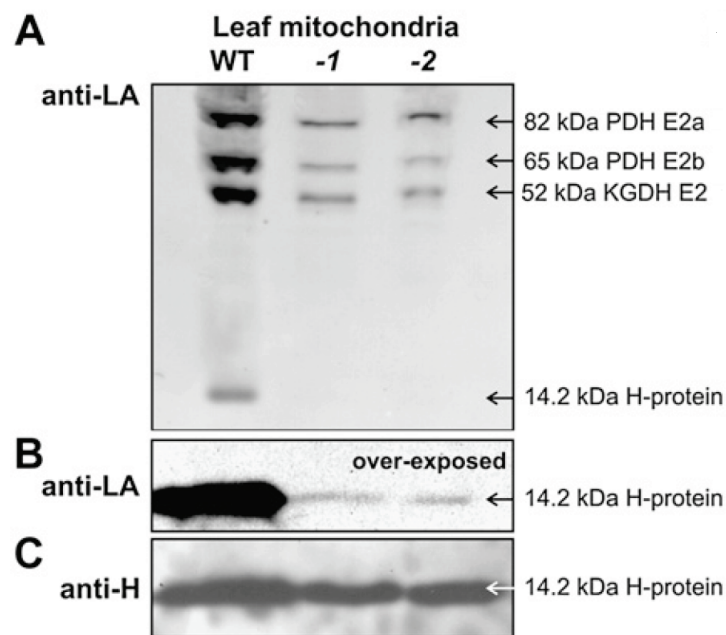


Abbildung 3.10 Restliche Proteinlipoylierung der E2-Untereinheiten und des H-Proteins in *mtkas*-Blattmitochondrien

Die E2-Untereinheiten der PDH und KGDH in *mtkas*-Blattmitochondrien weisen ca. 70 % weniger gebundene LA als im WT auf (A). Der marginale Liponsäure-Gehalt des H-Proteins konnte erst nach längerer Belichtungszeit detektiert werden und liegt im Gegensatz zu den E2-Untereinheiten bei < 5 % (B). Der Gehalt von unlipoyliertem H-Protein ist unbeeinflusst (C). Jeweils 3 µg mitochondriales Protein von unter Hoch-CO₂ angezogenen Pflanzen *mtkas-1* (-1), *mtkas-2* (-2) sowie Col-0 (WT) wurden für die Western Blot Analysen auf 12%ige SDS-Gele aufgetragen.

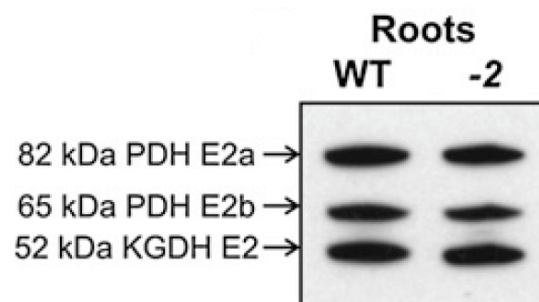


Abbildung 3.11 Proteinlipoylierung der E2-Untereinheiten in *mtkas*-Wurzeln

Jeweils 5 µg von löslichem Wurzelprotein von unter Hoch-CO₂ angezogenen Pflanzen *mtkas-2* (-2) sowie Col-0 (WT) wurden für die Western Blot Analysen auf 12%ige SDS-Gele aufgetragen, geblottet und der Gehalt von gebundener Liponsäure mit einem Serum gegen Liponsäure detektiert.

3.2 Mitochondriale Proteinlipoylierung – Lipoat-protein Ligase A

3.2.1 Identifikation und Expression einer Lipoat-protein Ligase A (AtLPLA) in *Arabidopsis*

Die mtKAS bildet die wichtige Vorstufe Octanoyl-ACP für die Proteinlipoylierung. Durch den Knock-out der mtKAS wird die Versorgung des Mitochondriums mit dieser Vorstufe unterbrochen. Eventuell können Mitochondrien noch über andere Stoffwechselwege Octanoyl-ACP produzieren, was bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch ungeklärt ist.

Eine weitere Möglichkeit der Proteinlipoylierung besteht in der Nutzung freier Octansäure bzw. freier Liponsäure, welche erst mit Hilfe von ATP/GTP aktiviert und anschließend auf die Apoproteine übertragen wird.

Bis 2007 waren nur Enzyme des Liponsäure-Biosyntheseweges in Pflanzen identifiziert worden (siehe 1.5.5). Die Veröffentlichung der Identifikation einer Lipoat-protein Ligase A im Jahr 2007 von Kang und Mitarbeitern zeigte erstmalig, dass die Pflanze Reis ebenfalls ein Enzym besitzt, welches freie Liponsäure und ATP nutzen kann um Proteine zu lipoylieren (*lipoate-scavenging*). Nun lag die Vermutung nahe, dass im Genom von *Arabidopsis* ebenfalls eine LPLA verschlüsselt vorliegt. Wiederum wäre ein solches Enzym, welches freie Octansäure/Liponsäure nutzt um Proteine zu lipoylieren, eine plausible Quelle für das gefundene Restlipoylierungsmuster in mtKAS Knock-out-Pflanzen, in denen keine bzw. kaum Octanoyl-ACP für den Liponsäure-Biosyntheseweg gebildet wird.

Mit Hilfe des BLAST-Tools wurden Sequenzen im *Arabidopsis*-Genom gesucht, die Ähnlichkeiten zur LPLA aus Reis (OsLPLA) aufweisen. Das Gen At3g29010 (AtLPLA) codiert eine Proteinsequenz für eine putative Lipoat-protein Ligase A (Abbildung 3.12), welche eine 74%ige Aminosäuresequenzidentität zur OsLPLA (O.s. EF015469) hat und hoch konservierte Domänen für die Bindung von Lipoyl-AMP und Apoproteinen aufweist (Kim et al., 2005; Fujiwara et al., 2005).

Von der OsLPLA wurde gezeigt, dass sie vorrangig in Blättern, in sich entwickelnden Samen und weniger in Blüten und Wurzeln exprimiert wird (Kang et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigt die AtLPLA nahezu ähnlich starke Transkriptgehalte in allen untersuchten Organen. Dies wurde durch RT-PCR Analysen gezeigt (Abbildung 3.13) und korrespondiert mit elektronischen Northern-Daten (<https://www.genevestigator.com/> und <http://www.bar.utoronto.ca/efp/>).

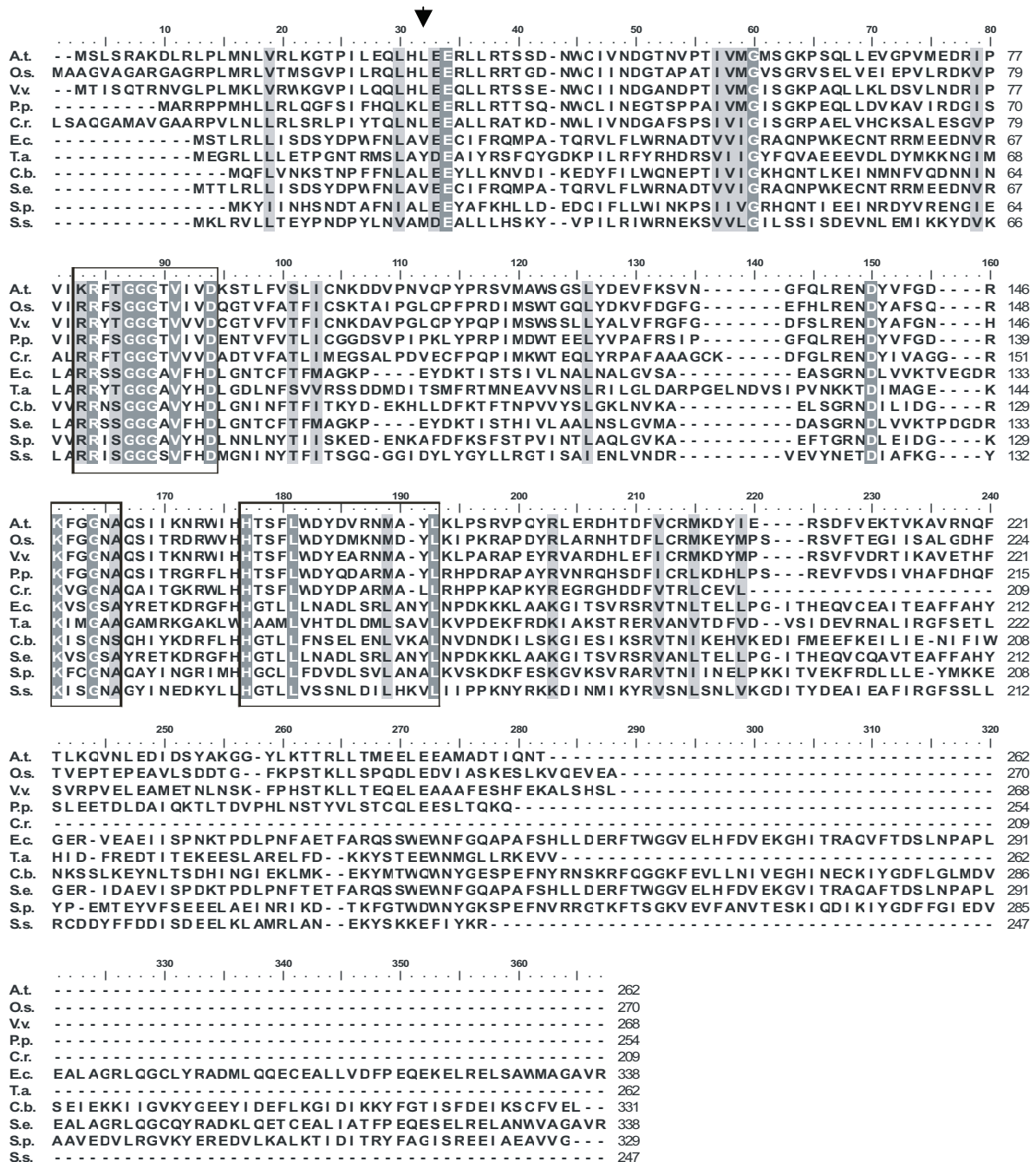


Abbildung 3.12 Aminosäuresequenzvergleich pflanzlicher und bakterieller Lipoat-protein Ligasen

Wichtige Bindungsdomänen beschrieben von Kim et al., 2005 sind durch Quadrate gekennzeichnet. Der Pfeil markiert die Mutationsposition der LPLA in einer *E. coli* LIPB Knock-out-Mutante, in der der Austausch zu L zu einer Verringerung der km Kinetik mit dem Substrat Octansäure führt (Hermes and Cronan, 2009). *Arabidopsis thaliana* (A.t. At3g29010); *Oryza sativa* (O.s. EF015469); *Vitis vinifera* putativ (V.v. XP_002281967); *Physcomitrella patens* putativ (P.p. XP_001779799); *Chlamydomonas reinhardtii* putativ (C.r. XP_001690266); *Escherichia coli* (E.c. AAA21740); *Thermoplasma acidophilum* (T.a. NP_393990); *Clostridium botulinum* (C.b. YP_001254137); *Salmonella enterica* (S.e. NP_458984); *Streptococcus pneumoniae* (S.p. NP_358641) *Sulfolobus solfataricus* (S.s. NP_344467)

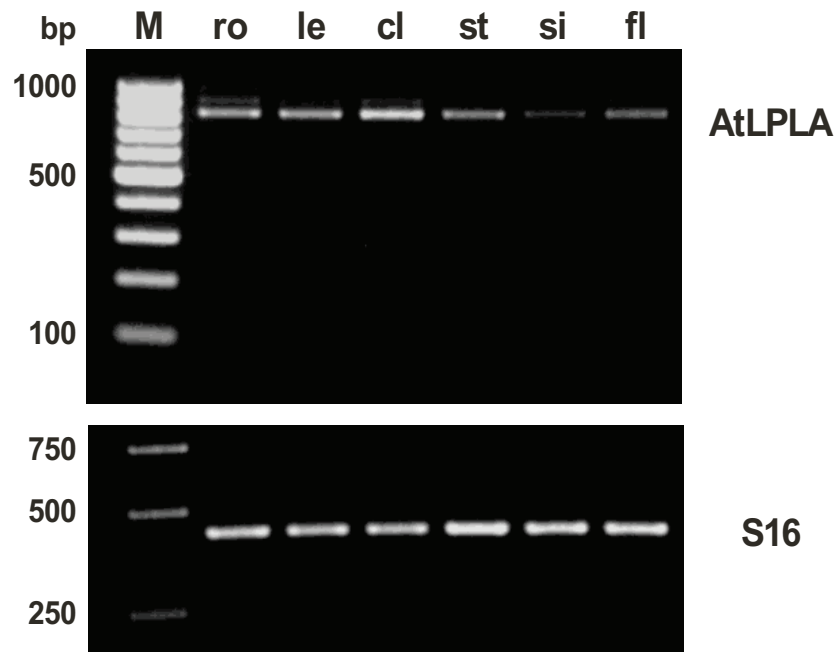


Abbildung 3.13 Organspezifische Expression des AtLPLA-Gens

Die Gehalte der AtLPLA mRNA in den verschiedenen Organen wurden durch RT-PCR (R1062/R1068) mit extrahierter Gesamt-RNA von Wurzeln (ro), Blättern (le), Hochblättern (cl), Stängeln (st), Schoten (si) und Blüten nachgewiesen. Die Gehalte der mRNA des 40S ribosomalen S16-Proteins dienten als Kalibrierung (Primerkombination R176/R177).

Während der Klonierung der AtLPLA cds in den Vektor pGEM-T wurde eine weitere Spliceform, in der das letzte Intron enthalten war, entdeckt. Zur näheren Untersuchung verschiedener Spliceformen wurden RT-PCR-Analysen mit verschiedenen Primern, welche z. B. in der Intronsequenz binden, durchgeführt. Es konnten verschiedene Transkriptformen amplifiziert werden. Die Sequenzierung dieser unterschiedlich langen Amplifikate ergab, dass mit zunehmender Größe jeweils ein Intron mehr in den Transkriptformen vorlag.

Das Vorkommen verschiedener Spliceformen von mRNAs ist ein häufig auftretendes Phänomen (Labadorf et al., 2010), führt jedoch nur bedingt zu verschiedenen Proteinformen ein und desselben Gens. In weiteren Untersuchungen musste geklärt werden, ob die gefundenen Transkriptformen der AtLPLA auch translatiert werden, was zu unterschiedlich langen Peptidketten führen würde. Die Befunde eines Western Blot (Abbildung 3.16) mit einem AtLPLA-Antikörper zeigten keine weiteren Signale unterschiedlicher Größe, sondern nur eine AtLPLA-Bande, welche der vorhergesagten Proteingröße eines translatierten Transkripts ohne Introns entsprach.

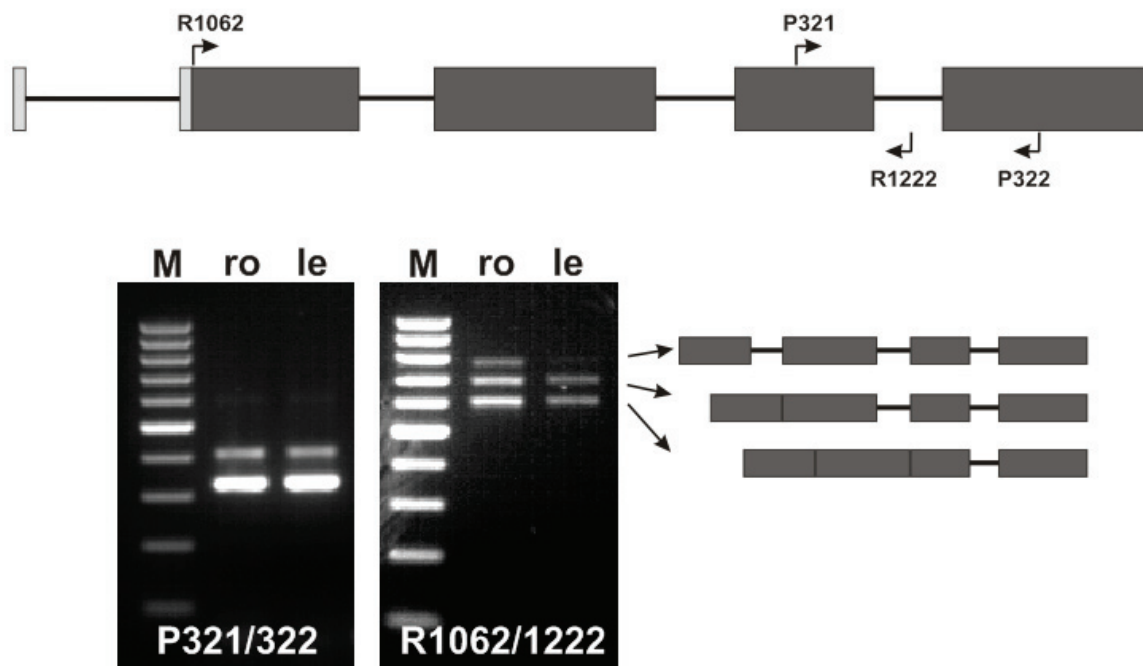


Abbildung 3.14 Detektierte AtLPLA Transkriptformen

Schematische Darstellung der Intron-Exon Struktur von AtLPLA mit der Lage der verwendeten Primer (oben), die für die PCR-Analysen (unten) der verschiedenen Spliceformen verwendet wurden (hellgrau – 5' UTR, dunkelgrau – cds, Strich – Intron, ro – Wurzel, le – Blatt).

3.2.2 Die *Arabidopsis* Lipoat-protein Ligase A ist mitochondrial lokalisiert

Programme wie iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>), welche die subzelluläre Lokalisation von Proteinen vorhersagen (Bannai et al., 2002), postulieren ein mitochondriales Transitpeptid für die OsLPLA und die AtLPLA. Um diese Vorhersagen zu bestätigen wurde ein Antiserum, welches die AtLPLA bindet, verwendet. Zur Herstellung des Antiserums wurde die gesamte kodierende Sequenz der AtLPLA (Primerkombination R1062/R1068) via PCR amplifiziert, in den Vektor pASK-IBA7plus kloniert und nach heterologer Expression in *E. coli* aufgereinigt (Abbildung 3.15, Methoden 2.2.15). Mit Hilfe des gereinigten Proteins konnte durch die Firma SeqLab ein Antiserum gegen die AtLPLA hergestellt werden (2.2.14), welches für Western Blot Analysen mit Mitochondrien-, Blatt- und Wurzelproteinextrakten eingesetzt wurde. Der angefertigte Blot belegte, dass die AtLPLA im Mitochondrium von *Arabidopsis* lokalisiert ist (Abbildung 3.16).

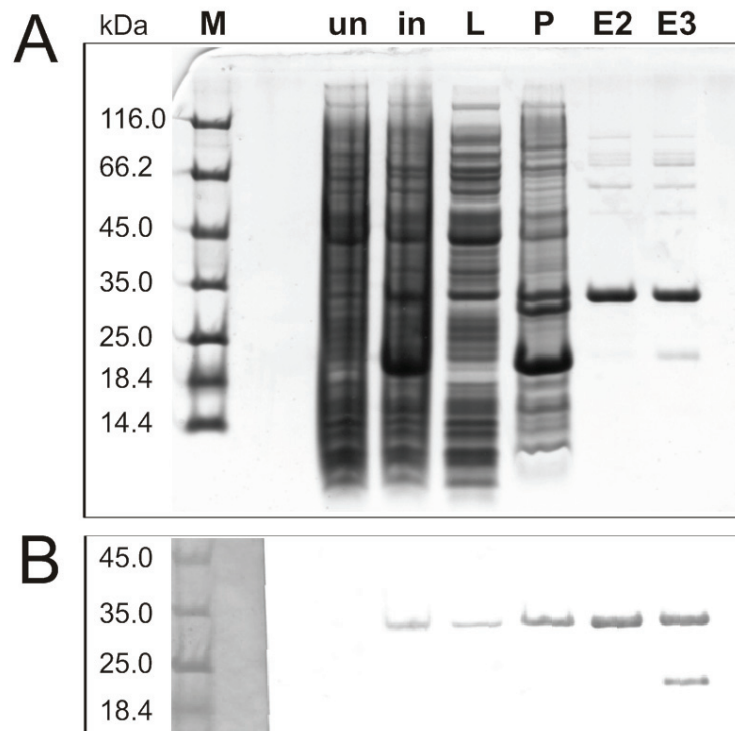


Abbildung 3.15 Heterologe Expression und Reinigung von AtLPLA

A: Tricin-SDS-Gel nach Coomassiefärbung, aufgetragen wurden mit pASK-IBA7plus/AtLPLA transformierte uninduzierte *E. coli* BL21 Zellen (un), induzierte Zellen (in), Lysat (L), Pellet (P) sowie die Eluate 2 und 3 nach Reinigung über Strep-Tactin-Säulchen. B: Western Blot mit Strep-Tactin AP conjugate eines analog angefertigten SDS-Gels.

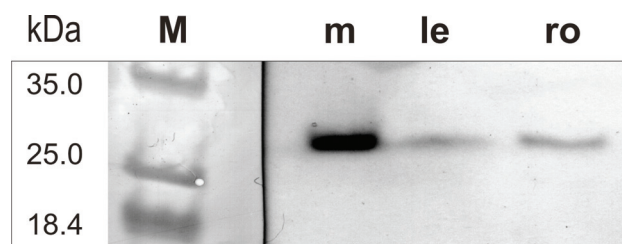


Abbildung 3.16 Die AtLPLA ist im Mitochondrium lokalisiert

Für den Western Blot wurden jeweils 10 µg Proteinextrakt von Mitochondrien (m), Blättern (le) und Wurzeln (ro) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde der Gehalt von AtLPLA Protein mit einem Antiserum gegen die AtLPLA detektiert.

3.2.3 AtLPLA Komplementationsanalysen und Studien der enzymatischen Aktivität

Um die enzymatische Aktivität der putativen Lipoat-protein Ligase A aus *Arabidopsis* (At3g29010) zu bestätigen und zu demonstrieren, dass dieses Enzym die Möglichkeit besitzt, Proteine *in vivo* zu lipoylieren, wurden Expressionsvektoren mit der *full length* cds der AtLPLA in den auxotrophen *E. coli* Stamm TM137 (Morris et al., 1995) transformiert. Aufgrund der Tatsache, dass keine Expression des AtLPLA Proteins nach Transformation von TM137 mit pASK-IBA7plus/AtLPLA detektiert werden konnte (nicht gezeigt), wurden TM137 Zellen mit dem Vektor pBAD-HisA/AtLPLA transformiert. Mittels Western Blot mit einem His-tag Antikörper wurde bestätigt, dass positiv transformierte TM137/pBAD-HisA/AtLPLA Klone nach Induktion mit 0,2 % Arabinose die AtLPLA heterolog exprimieren (Abbildung 3.17 B)

Der Stamm TM137, mit einem Knock-out im Liponsäure-Biosyntheseweg und im *lipoate-scavenging* (*lipB*, *lplA*), benötigt Acetat und Succinat im Minimalmedium (Kompensation des Verlustes der PDH und KGDH Aktivität) für adäquates Wachstum. Zusätzlich wurden 0,5 mg/l LA in das Wachstumsmedium gegeben und der Status der Proteinlipoylierung von uninduzierten und induzierten Zellen mit einem LA-Antikörper (2.2.14) analysiert.

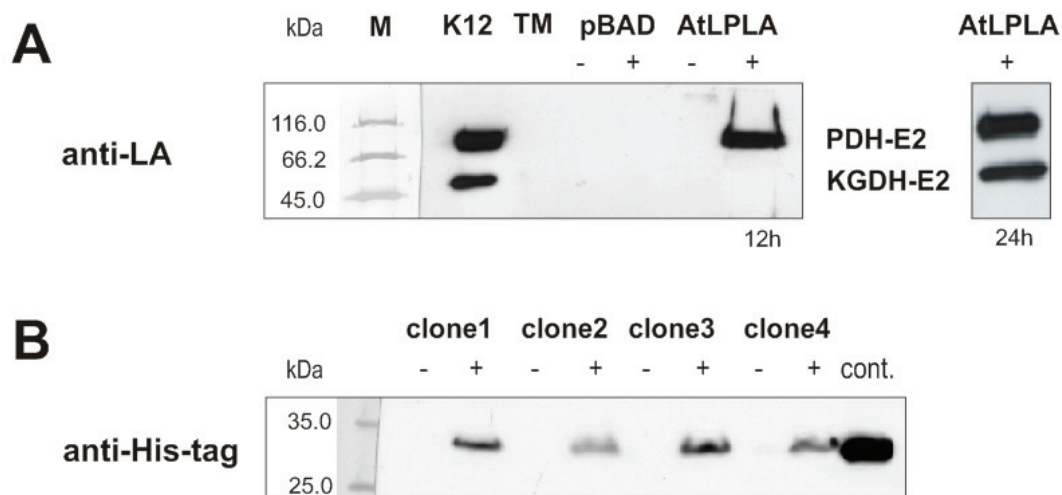


Abbildung 3.17 *In vivo* Lipoylierung der PDH und KGDH E2-Untereinheiten durch AtLPLA

A: Die *E. coli* PDH E2-Untereinheit wird schneller lipoyliert als die KGDH E2-Untereinheit, welche erst mehr als 12 Stunden nach Induktion mit Arabinose (+) sichtbare Gehalte von gebundener LA aufweist. Dies weist auf eine höhere Präferenz der AtLPLA zur PDH E2-Untereinheit hin. K12 – *E. coli* K12 Kontrolle, TM – TM137 (*lipB/lplA*) Nullmutante, pBAD – mit leerem pBAD-HisA Vektor transformierte TM137 Zellen, AtLPLA – mit pBAD-HisA/AtLPLA transformierte TM137 Zellen. B: Western Blot je 10

µg Gesamtproteinextrakt von uninduzierten (-) bzw. mit 0,2% Arabinose induzierten (+) TM137/pBAD-HisA/AtLPLA Klonen. Als Kontrolle dienten 5 µg gereingte AtLPLA mit His-tag (cont.).

Nach einer Induktionszeit von 12 Stunden konnte nur eine Proteinlipoylierung der Pyruvat-Dehydrogenase festgestellt werden. Erst 24 Stunden nach Induktion war auch ein Signal, welches einer Lipoylierung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase entsprach, sichtbar (Abbildung 3.17). Um auszuschließen, dass diese Befunde durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen der PDH und KGDH verursacht wurden, wurde die K12-Proteinextraktmenge (*E. coli* Wildtypstamm) für den Western Blot so gewählt, dass das Signal der PDH der Stärke der PDH in den induzierten, mit pBAD-HisA/AtLPLA transformierten, TM137 Zellextrakten entsprach.

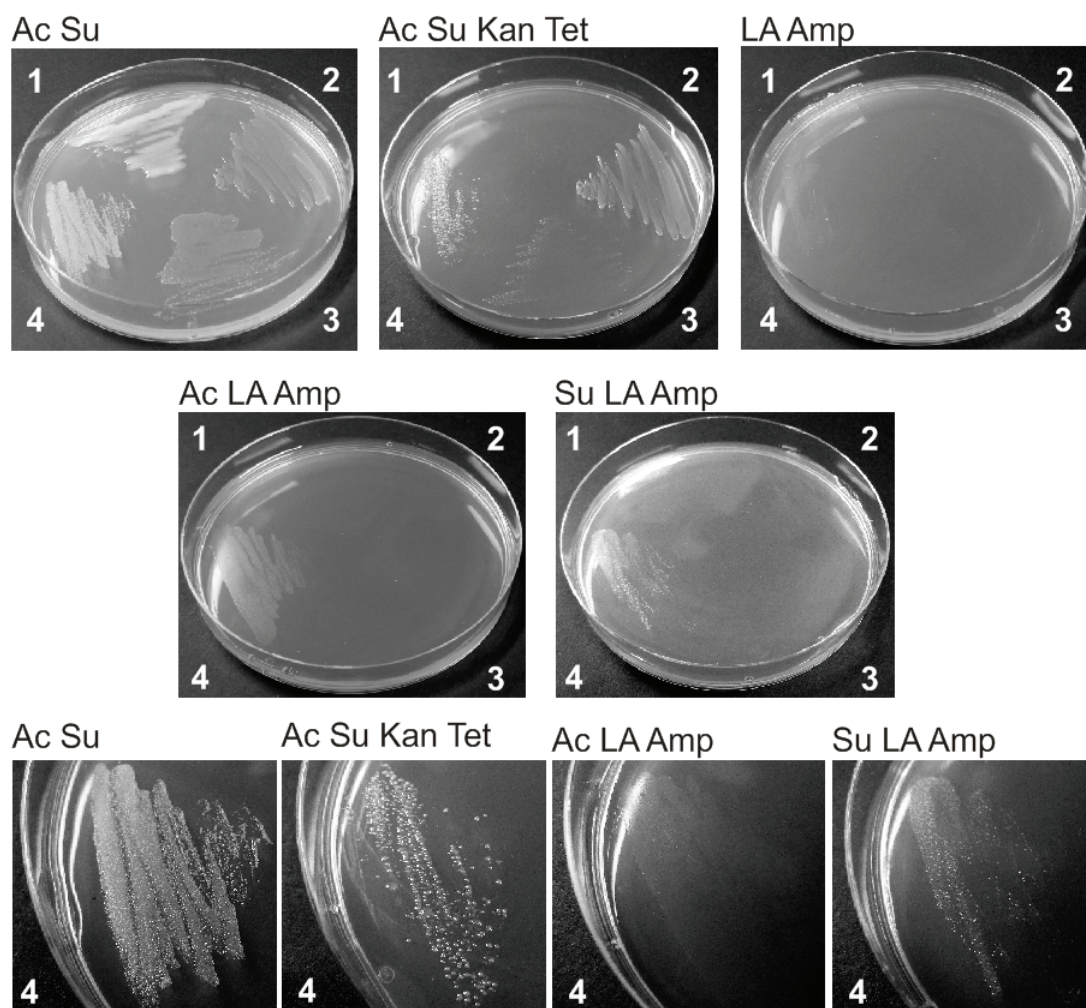


Abbildung 3.18 Genetische Komplementation der *E. coli lipB/lplA* Nullmutante TM137 durch die Expression der AtLPLA cds

1 – K12 (*E. coli* Wildtyp); 2 – TM137 (*lipB/lplA* Mutante); 3 – TM137 transformiert mit pBAD-HisA und 4 – TM137 transformiert mit pBAD-HisA/AtLPLA. Die Zellen wurden auf Minimalagar-Platten (M9) mit 0,2 % Arabinose ausgestrichen, die verschiedene zusätzliche Substanzen enthielten; 0,4 % Glukose

(G), 5 mM Na-Acetate (A), 5 mM Na-Succinat (S), 50 µg/mL Kanamycin (Kan), 10 µg/mL Tetracycline (Tet), 50 µg/mL Ampicillin (Amp), 500 ng/mL *lipoic acid* (LA). Die Platten wurden für zwei Tage bei 37 °C inkubiert.

Auch bei Anzucht auf M9-Minimalagar-Platten wurde ebenfalls nur eine sehr schwache Komplementation der TM137 Mutante durch die exprimierte AtLPLA detektiert (Abbildung 3.18 Pfeil). Auf Platten, bei denen Acetat und Succinat ins Medium gegeben wurde, wuchsen sowohl der *E. coli* Wildtypstamm K12 als auch untransformierte und transformierte TM137 Zellen (Abbildung 3.18). Wurden zusätzlich die Antibiotika, für die in TM137 eingefügten Resistenzkassetten Tetracyclin und Kanamycin (LIPB, LPLA Knock-out) hinzugegeben, wuchsen alle TM137 Zellen. Der K12 Stamm konnte aufgrund der fehlenden Resistenzkassette nicht wachsen. Bei Austrich auf M9-Platten mit Zusatz von Liponsäure und Ampicillin (Resistenzkassette pBAD-HisA) konnten K12, TM137, TM137/pBAD-HisA Zellen nicht wachsen, da den Stämmen K12 und TM137 die Amp-Resistenzkassette fehlt und TM137/pBAD-HisA Zellen Acetat und Succinat zum Überleben benötigen. Die TM137 Zellen, welche mit pBAD-HisA/AtLPLA transformiert wurden, wuchsen nur minimal. Es konnte nur ein sehr schwacher Bakterienfilm detektiert werden (Abbildung 3.18 Bild 3). Zur Bestätigung der Befunde, dass die *E. coli* PDH-E2 Untereinheit präferentiell durch die AtLPLA lipoyliert wird, wurden die Zellen auch auf M9-Platten, in denen sich entweder nur Acetat oder nur Succinat befand, ausgestrichen. Es konnte ein stärkeres Wachstum der TM137/pBAD-HisA/AtLPLA Zellen auf den M9-Platten mit Zugaben von Succinat im Vergleich zu Platten mit Zugabe von Acetat detektiert werden. Diese Beobachtung unterstrich den Befund, dass die PDH schneller als die KGDH durch die AtLPLA lipoyliert wird. Zusätzlichen Wachstumstest der verschiedenen *E.coli* Stämme in M9-Minimalmedium dienten anschließend dazu, diese visuellen Befunde mit messbaren Daten zu hinterlegen. Um die Überexpression der AtLPLA in der Mutante TM137 zu stimulieren wurden dem M9-Minimalmedium zusätzlich 40 µg/ml Casaminoacids (Difco) zugefügt. Diese Wachstumsstudien in Flüssigkultur bestätigten die Ergebnisse der M9-Platten-Wachstumstest (Abbildung 3.19). Anhand der gemessenen optischen Dichten wurde ersichtlich, dass die AtLPLA zu keinem verbesserten Wachstum der TM137-Mutante führte. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Zugabe von Succinat (KGDH-Bypass) zu einem signifikant höherem Wachstum im Vergleich zu der alleinigen Zugabe von Acetat (PDH-Bypass) führt, was mit den Befunden der präferentiellen Lipoylierung der PDH-E2 Untereinheit korreliert.

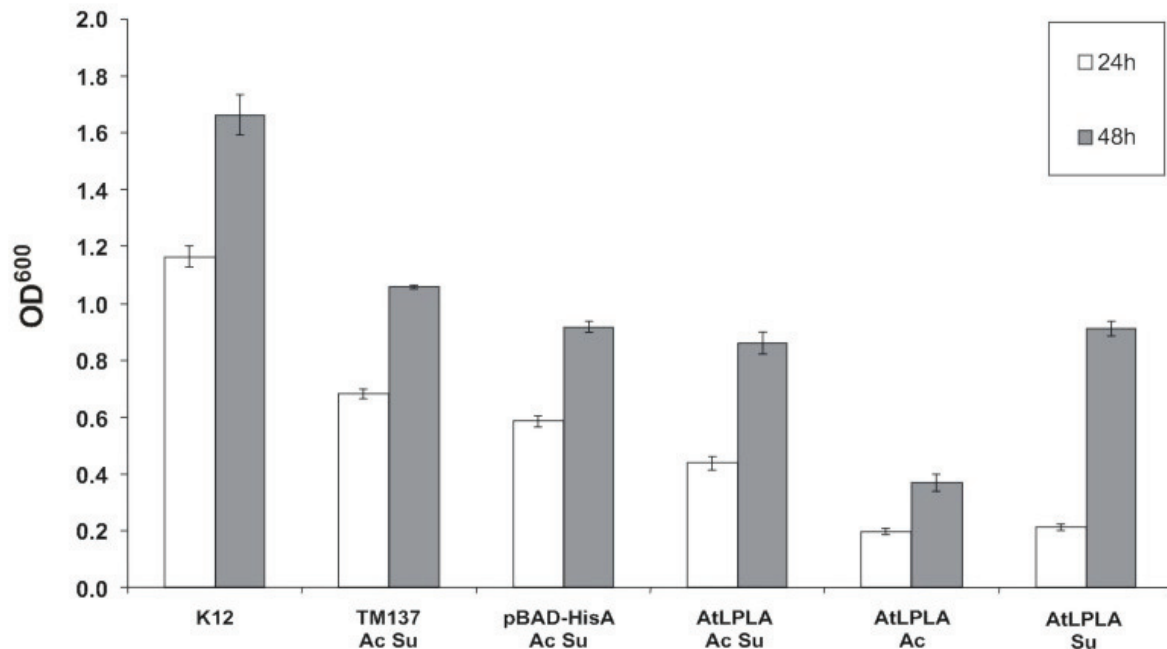


Abbildung 3.19 Wachstumsstudien von *E. coli* Stämmen in M9-Minimalmedium

Die optischen Dichten (OD 600 nm) der verschiedenen *E. coli* Stämme, K12 (*E. coli* Wildtyp), TM137 (*lipB/pIA* Mutante), TM137 transformiert mit pBAD-HisA, TM137 transformiert mit pBAD-HisA/AtLPLA, wurden nach 24 und 48 Stunden gemessen. Hierzu wurden je 0,5 ml (OD 0,75) Zellkultur in 50 ml M9-Minimalmedium mit 0,2 % Arabinose, 0,4 % Glukose, 40 µg/ml Casaminoacids, 500 ng/mL *lipoic acid* (LA) gegeben, welches verschiedene zusätzliche Substanzen, 5 mM Na-Acetate (A), 5 mM Na-Succinat (S), sowie die entsprechenden Antibiotika (TM137 Kan,Tet; TM137/pBAD-HisA Kan, Tet, Amp; TM137/pBAD-HisA/AtLPLA Kan, Tet, Amp), enthielt. Die Kulturen wurden bei 28 °C und 200 rpm inkubiert.

Parallel zu den Komplementationsexperimenten wurden auch *in vitro* Analysen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität heterolog exprimierter AtLPLA (Abbildung 3.15) angefertigt. Hierbei wurden radioaktiv markierte Octansäure (¹⁴C-Octanoat), ATP und unlipoylierte Apoproteine als Substrat eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel konnte die gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Röntgenfilms bzw. eines Phosphorimagers nachgewiesen werden. Als Apoprotein diente zum einen das Lysat der *E. coli* Mutante TM137, zum anderen wurden Proteine aus *Arabidopsis* (H-Protein, KGDH-E2) in der Mutante TM137 heterolog exprimiert, da diese Mutante im Gegensatz zu herkömmlichen *E. coli* Expressionsstämmen keine Enzyme zur Proteinlipoylierung besitzt (2.2.20). Auch Matrixextrakt von isolierten *mtkas-2* Mitochondrien wurde als Quelle für pflanzliche Apoproteine eingesetzt, weil ein Großteil der Proteine in diesen Mitochondrien

unlipoyliert vorliegt. Als Positiv-Kontrolle wurde anstelle der AtLPLA die exprimierte und gereinigte LPLA aus *E. coli* (Hasse et al., 2009) verwendet. Die Negativ-Kontrolle enthielt kein Enzym. Trotz vielfältiger Versuche (z. B. Überexpression und Aufreinigung der AtLPLA mit verschiedenen Vektorsystemen, Entfernung des Step-tag durch Protease-Behandlung usw.) konnte anfänglich keine Aktivität der AtLPLA bei einer eingesetzten Enzymmenge von 2,5 µg pro 100 µl Ansatz (siehe 2.2.20) detektiert werden. Hingegen wiesen die Apoproteine des Reaktionsansatzes der Positiv-Kontrolle, in der 2,5 µg der LPLA aus *E. coli* verwendet wurde, eindeutige Signale radioaktiv gebundener Octansäure auf. Erst bei einer Zugabe von 8 µg AtLPLA konnte eine schwache, radioaktiv markierte Proteinbande detektiert werden. Die Aktivität der heterolog exprimierten AtLPLA schien demzufolge um ein vielfaches geringer als die der Lipoat-protein Ligase A aus *E. coli* zu sein. Auch die Erhöhung der Enzymmenge der AtLPLA auf bis zu 20 µg des aufgereinigten Proteins pro 100 µl Ansatz, sowie die Verwendung größerer Mengen bakterieller und pflanzlicher Apoproteine zeigte keine Verbesserung der Resultate (Abbildung 3.20).

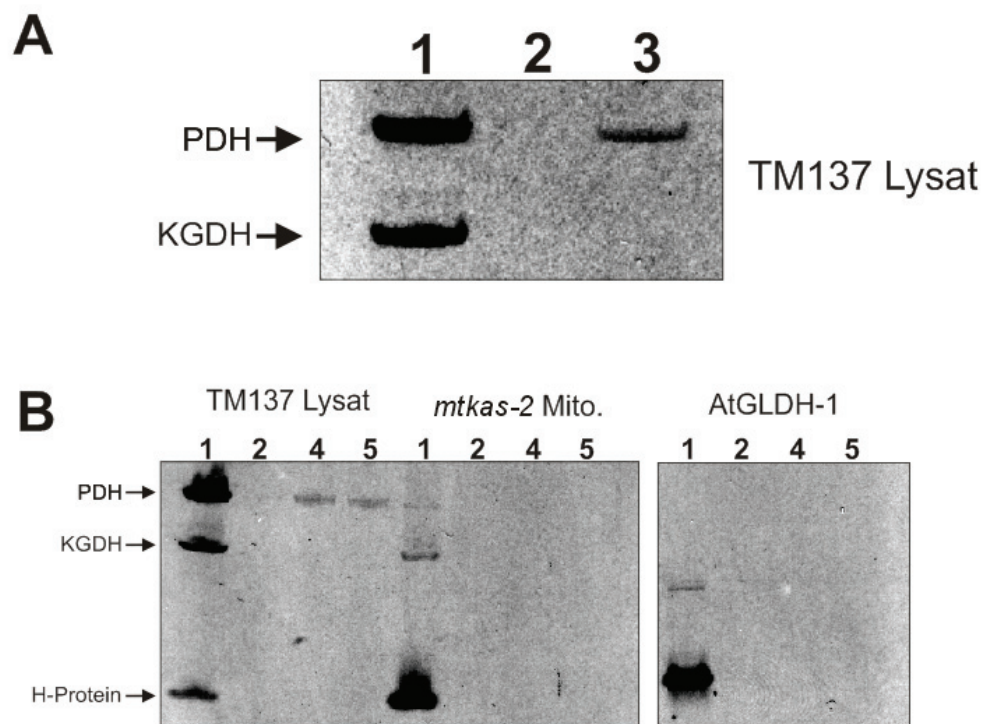


Abbildung 3.20 Die LPLA aus *Arabidopsis* zeigt nur marginale Enzymaktivität im *in vitro* Assay mit ^{14}C -Octanoat.

In einem 100 µl LPLA-Ansatz wurden 8 µg (3), 10 µg (4) bzw. 20 µg (5) aufgereinigter AtLPLA eingesetzt (Methode siehe 2.2.20). Als Positiv-Kontrolle dienten 2,5 µg EcLPLA (1), in der Negativ-Kontrolle wurde kein Enzym hinzugefügt (2). Als Apoproteine wurden 50 µg (A) bzw. 87 µg (B) TM137 Lysat, 45 µg *mtkas-2* mitochondriales Protein (B, *mtkas-2* Mito) oder 8,6 µg unlipoyliertes AtGLDH1-Protein hinzugefügt.

Im Jahre 2009 konnten zwei unabhängige Arbeitsgruppen parallel zeigen, dass das Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* zwei Proteine für die Lipoylierung von Apoproteinen mit freier Liponsäure und ATP benötigt bzw. besitzt (Christensen and Cronan, 2009; Posner et al., 2009). Generell können Lipoat-protein Ligasen verschiedener Organismen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Der ersten Gruppe gehören LPLAs mit einer kürzeren Aminosäuresequenz von ca. 250-280 AS an. Zur zweiten Gruppe zählen LPLAs mit einem längeren C-Terminus von ca. 330 AS (Beispiele siehe Abbildung 3.12). Dieser C-Terminus, auch CTD genannt (*C-terminal domain*), übernimmt eine wichtige Funktion als „Helferdomäne“ (*accessory domain*) bei der Aktivierung von Lipoat/Octanoat und ATP zu Lipoyl/Octanoyl-AMP. In *T. acidophilum* mit der kürzeren Form der LPLA wird diese *accessory domain* durch ein separates Gen/Protein ersetzt, welches auch als LPLB bezeichnet wird (Christensen and Cronan, 2009). Da die pflanzlichen LPLAs zu der Gruppe der kürzeren LPLAs gehören (Abbildung 3.12), lag die Vermutung nahe, dass in Pflanzen ebenfalls ein weiteres Enzym vorkommt, welches die Funktion der LPLB übernimmt. BLAST *search* Analysen mit bekannten LPLB (CTD) Sequenzen gegen das *Arabidopsis* Genom ergaben jedoch keine Hinweise auf ein homologes pflanzliches Protein, was daran liegen könnte, dass es sich um ein sehr kurze Aminosäuresequenzen (ca. 80-100 AS), zum anderen um Sequenzen mit sehr geringen Sequenzhomologien handelt

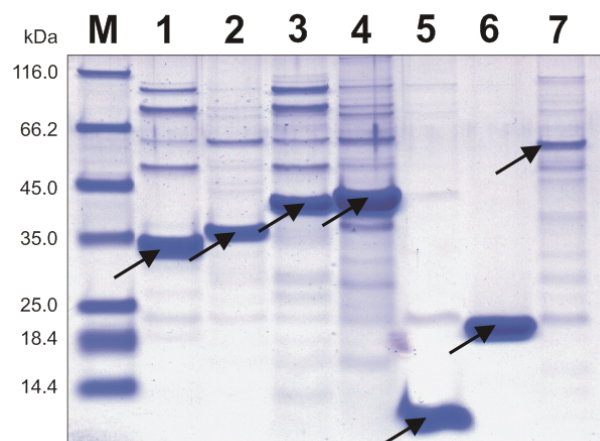


Abbildung 3.21 Coomassie gefärbtes SDS-Gel heterolog exprimierter pflanzlicher LPLAs, chimärer LPLA-CTD Proteine, CTD der *E. coli* LPLA und unlipoylierter pflanzlicher Apoproteine (H-Protein, KGDH-E2)

Pro Spur wurden je 15 µl Eluat 2 (gereinigt über Strep-Tactin Matrix) von AtLPLA (1), OsLPLA (2), AtLPLA-CTD (3), OsLPLA-CTD (4), CTD der *E. coli* LPLA (5), unlipoyliertes AtGLDH1-Protein (6) und AtKGDH-E2 (7) aufgetragen.

Aus diesem Grund wurden chimäre Proteine bestehend aus der pflanzlichen katalytischen LPLA Domäne (*A. thaliana*, *O. sativa*) und der 85 AS langen CTD von *E. coli* kloniert

(2.2.19), heterolog exprimiert und aufgereinigt (Abbildung 3.21). Diese heterolog exprimierten und gereinigten chimären Proteine wurden ebenfalls mit Hilfe des LPLA *in vitro* Assays auf ihre enzymatische Aktivität getestet (Abbildung 3.22 Spur 2 und 3). Jedoch führte die Fusion aus pflanzlichen LPLAs und der CTD der *E. coli* LPLA nicht zur erhofften enzymatischen Aktivität mit den Substraten Octanoat, ATP und verschiedenen unlipoylierten Apoproteinen. Auch in Ansätzen mit nicht fusionierten Proteinen, pflanzliche LPLAs und CTD der *E. coli* LPLA konnten keine radioaktiv markierten Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 Spur 4 und 5).

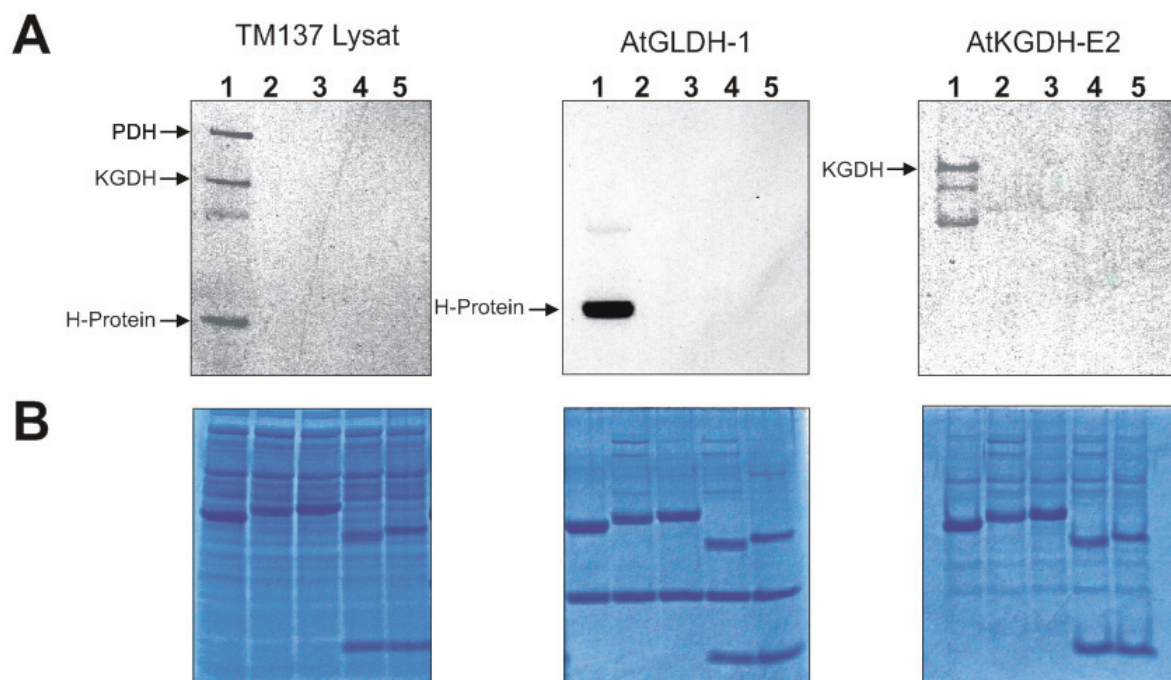


Abbildung 3.22 Die Fusion von pflanzlichen LPLAs und der CTD der *E. coli* LPLA führt zu keiner Erhöhung der *in vitro* Octanoylierung verschiedener Apoproteine.

In einem 100 µl LPLA-Ansatz wurden je 2,5 µg aufgereinigter AtLPLA-CTD (2) oder OsLPLA-CTD (3) eingesetzt bzw. 2,5 µg AtLPLA + 2,5 µg CTD oder 2,5 µg OsLPLA + 2,5 µg CTD (Methode siehe 2.2.20). Als Positiv-Kontrolle dienten 2,5 µg EcLPLA (1). Als Apoproteine dienten 50 µg TM137 Lysat, 2,5 µg unlipoyliertes AtGLDH1 Protein bzw. ca. 0,3 µg unlipoyliertes AtKGDH-E2 Protein. A, Nachweis des gebundenen ^{14}C -Octanoat mittels ECL-Film. B, Coomassie gefärbte und auf Whatmanpapier getrocknete SDS-Gele.

3.2.4 Die *Arabidopsis* Lipoat-protein Ligase A ist ein essentielles Enzym für die Samenentwicklung

In dem Bakterium *E. coli* dient die Lipoat-protein Ligase A der Rückführung bzw. Nutzung externer Liponsäure/Octansäure. Ein Fehlen des Enzyms beeinträchtigt jedoch nicht das Wachstum der Zellen, da sie aufgrund eines vollständigen Liponsäure-Biosyntheseweges (LIPA, LIPB) zur Proteinlipoylierung befähigt sind. Welche Bedeutung die AtLPLA für Wachstum von Pflanzen einnimmt, sollte mit Hilfe von AtLPLA Knock-out-Mutanten geklärt werden. Hierfür wurde eine T-DNA-Insertionsmutante (SALK_003427 *lplA-1*) von NASC geordert, bei der sich T-DNA-Insertion im Gen At3g29010 befinden sollte (Abbildung 3.23). Nach Anzucht der erhaltenen Samen konnte die T-DNA-Insertion mittels PCR in einer Pflanze bestätigt werden. Über 60 Nachkommen dieser heterozygoten Pflanze wurden mit PCR auf den Inhalt und die Zygotie der T-DNA untersucht. Es konnten keine homozygoten T-DNA-Insertionsmutanten isoliert werden. Aus diesem Grund wurden die Schoten von heterozygoten *lplA-1* Pflanzen näher betrachtet. In diesen Schoten waren ca. ein Viertel der Samen in jungen Schoten kleiner und heller bzw. in älteren Schoten bräunlich und deformiert (Abbildung 3.24). Diese Deformation von einem Viertel der Samen (Verhältnis normale/deformierte Samen: WT 449/3; *lplA-1* 327/111) lässt auf einen embryoletalen Phänotyp schließen. Mit der sogenannten Hoyerschen Lösung (Protokoll siehe www.seedgenes.org) wurden sowohl normale als auch deformierte Samen von heterozygoten *lplA-1* Knock-out-Mutanten entfärbt und mikroskopisch betrachtet. Hierbei konnten in den normalen Samen Embryonen der verschiedenen Stadien (z. B. *heart stage*) detektiert werden, während in den defekten Samen keine, sich entwickelnden Embryonen nachgewiesen werden konnten. Um den endgültigen Beweis zu erbringen, dass die deformierten Samen homozygote *lplA-1* Individuen sind, wurden 2-4 Samen in 10 µl Tris-HCl Puffer (10mM, pH 8,0) gemörsert und nach 5 minütigem Erhitzen bei 95 °C 1 µl als PCR-Template eingesetzt. Als Referenz dienten Samen einer Wildtyppflanze. In den defekten Samen konnte die Insertion der T-DNA nachgewiesen werden und erwartungsgemäß keine wildtypische Allelbande. Es handelt sich dementsprechend bei den defekten Samen um die homozygoten Nachkommen der heterozygoten parental Pflanzen.

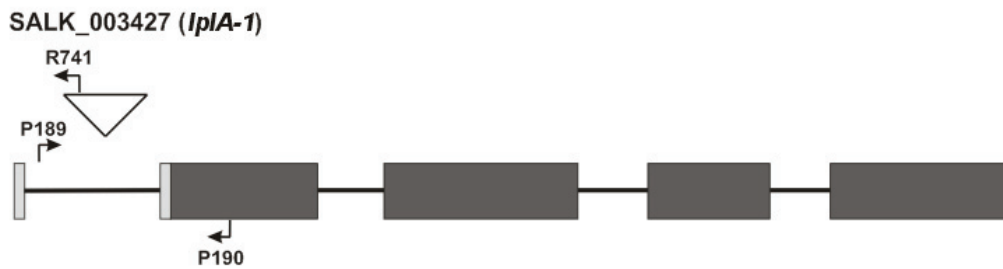


Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Lage der T-DNA Insertion in Linie SALK_003427 und verwendeter Primer

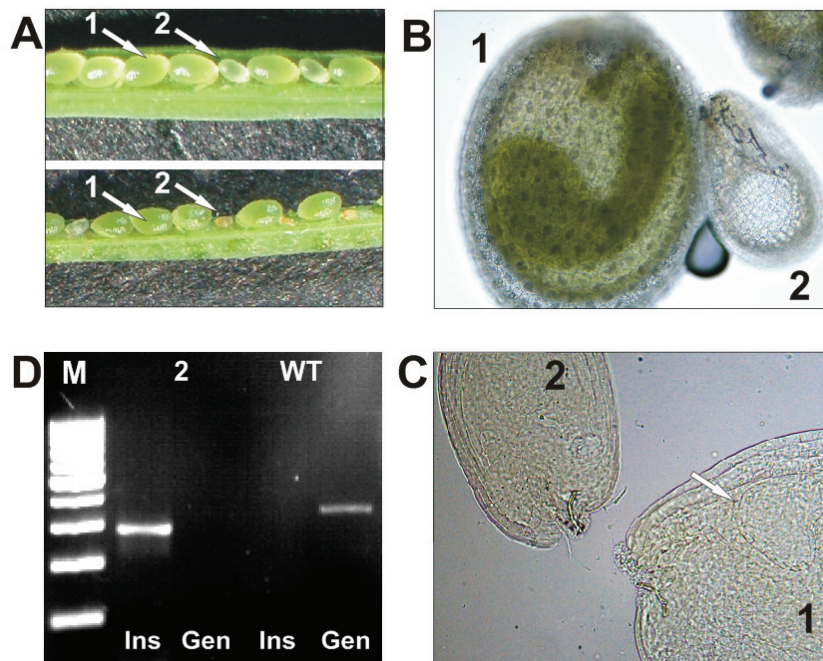


Abbildung 3.24 Der Knock-out der AtLPLA führt zu einem embryoletalen Phänotyp

A, B: Mikroskopische Aufnahmen von Schoten und Samen heterozygoter *lplA-1* (SALK_003427) Knock-out-Mutanten. Jüngere Schoten weisen normale (1) und kleine, hellere Samen (2) auf. In älteren Schoten sterben diese bräunlichen Samen (2) ab.

C: In den normalen Samen waren Embryonen im Herzblattstadium nachweisbar (1, Pfeil), hingegen konnten in den defekten Samen keine, sich entwickelnden Embryonen nachgewiesen werden (2).

D: Die Insertion (Ins) der T-DNA in den defekten Samen (Primerkombination R189/R741) sowie die Zygoteie der T-DNA (Gen, Primerkombination R189/190) wurde mittels PCR nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Samen von Wildtyppflanzen (WT). M, 100 bp ladder Fermentas.

3.2.5 AtLPLA-RNAi-Pflanzen

Da ein Knock-out der AtLPLA zu einem embryoethalen Phänotyp führt, wurden AtLPLA-RNAi-Pflanzen erzeugt (2.2.21) um die Auswirkungen einer Reduktion dieses Enzyms in der Pflanze zu untersuchen.

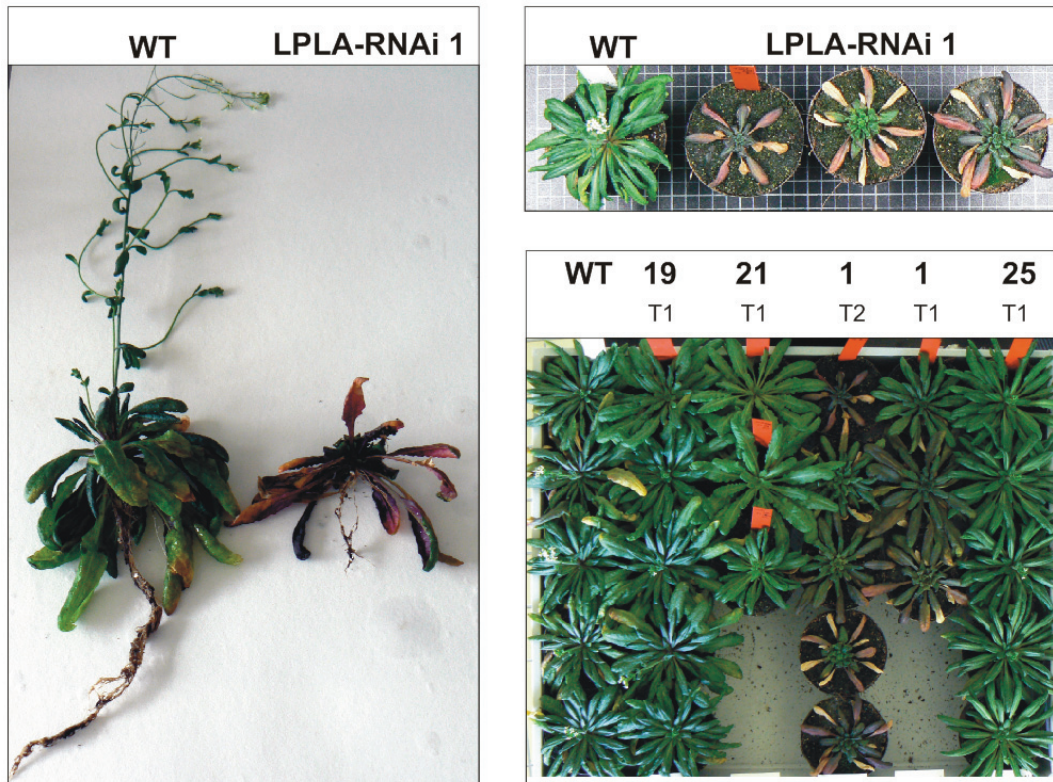


Abbildung 3.25 Erscheinungsbild von AtLPLA-RNAi-Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen

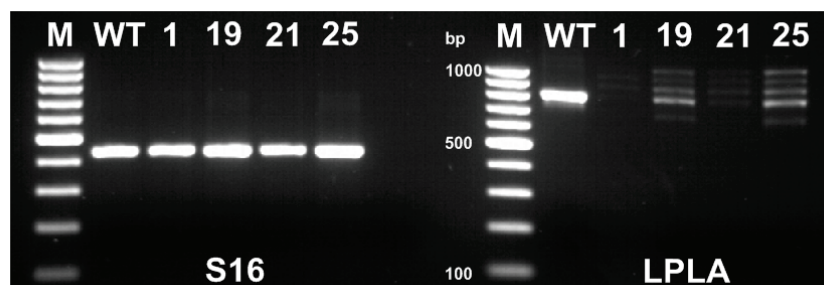


Abbildung 3.26 AtLPLA-RNAi-Linien zeigen reduzierte AtLPLA-Transkriptgehalte

RT-PCR zum Nachweis der Blatt AtLPLA mRNA-Gehalte in AtLPLA-RNAi-Linien (Primerkombination R1062/R1068) im Vergleich zum Wildtyp. Die Transkriptgehalte des konstitutiv exprimierten 40S ribosomalen Proteins S16 dienen als Ladekontrolle (Primerkombination R176/R177).

Die Pflanzen von vier unabhängigen AtLPLA-RNAi-Linien (1, 19, 21, 25) sowie Wildtyppflanzen wurden unter 1 % CO₂ (Lichtperiode hell/dunkel: 10/14 h) angezogen und das Wachstum der Pflanzen analysiert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Hoch-CO₂ (Bedingungen unterdrückter Photorespiration), da die Auswirkungen der AtLPLA-Reduktion auf das H-Protein unbekannt waren. Die Pflanzen der T1-Generation (erste Nachkommen positiv selektierter Pflanzen) der Linien 19, 21 und 25 zeigten keine sichtbaren Veränderungen im Wachstum im Vergleich zu mitgeführten Wildtyppflanzen. Hingegen zeigten Pflanzen der Linie 1 (T1 und T2 Generation) nach ca. 6 Wochen auffällige Stresserscheinungen. Dies spiegelte sich in einer violetten Verfärbung der Blätter (Vanderauwera et al., 2005) sowie im Absterben der äußeren Source-Blätter wieder. Ebenfalls konnte bei Pflanzen der Linie 1 ein reduziertes Wurzelwachstum festgestellt werden (Abbildung 3.25).

Die Untersuchung der Transkriptreduktion der AtLPLA mittels RT-PCR ergab eine signifikante Reduktion der AtLPLA-mRNA in allen 4 Linien. Hierbei wiesen die Linien 1 und 21 eine stärkere Reduktion als die Linien 19 und 25 auf (Abbildung 3.26). Die Resultate der RT-PCR Untersuchungen konnten durch einen Western Blot mit dem AtLPLA-Antikörper bestätigt werden. Auch auf Proteinebene zeigten die Linien 1 und 21 eine verstärkte Reduktion der AtLPLA im Vergleich zu den Linien 19 und 25 (Abbildung 3.27, anti-LPLA).

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Lipoylierungsmusters in den AtLPLA-RNAi-Linien zeigten eine drastisch verringerte Lipoylierung der Wurzelproteine von Linie 1 und 21. In Wurzeln führte die Reduktion der AtLPLA zu einer gleichmäßigen Abnahme der Liponsäure-Gehalte an den unterschiedlichen E2-Untereinheiten der PDH und KGDH. Im Gegensatz dazu wies die verminderte Lipoylierung der Blattproteine der Linie 1 ein abgestuftes Muster auf. Während beim H-Protein keine Veränderungen im Liponsäure-Gehalt festgestellt werden konnte, zeigte die KGDH E2-Untereinheit eine deutliche Abnahme gebundener Liponsäure. Die stärkste Reduzierung lag augenscheinlich bei den E2-Untereinheiten der PDH vor. Die Stärke der ermittelten LA-Reduktionen in den unterschiedlichen Linien korrelierten mit den nachgewiesenen Reduktionsstärken der AtLPLA. Nur bei den Pflanzen der Linie 1 konnten signifikante Veränderungen im Wachstum festgestellt werden. Das restliche Blatt- und Wurzel-Lipoylierungsmuster zeigte auf, dass die wichtigen Enzyme des TCA-Zyklus, PDH und KGDH, durch das Fehlen des Co-Faktors Liponsäure im stärkstem Maße in ihrer Aktivität in dieser Linie eingeschränkt waren, was die phänotypischen Veränderungen verständlich machte.

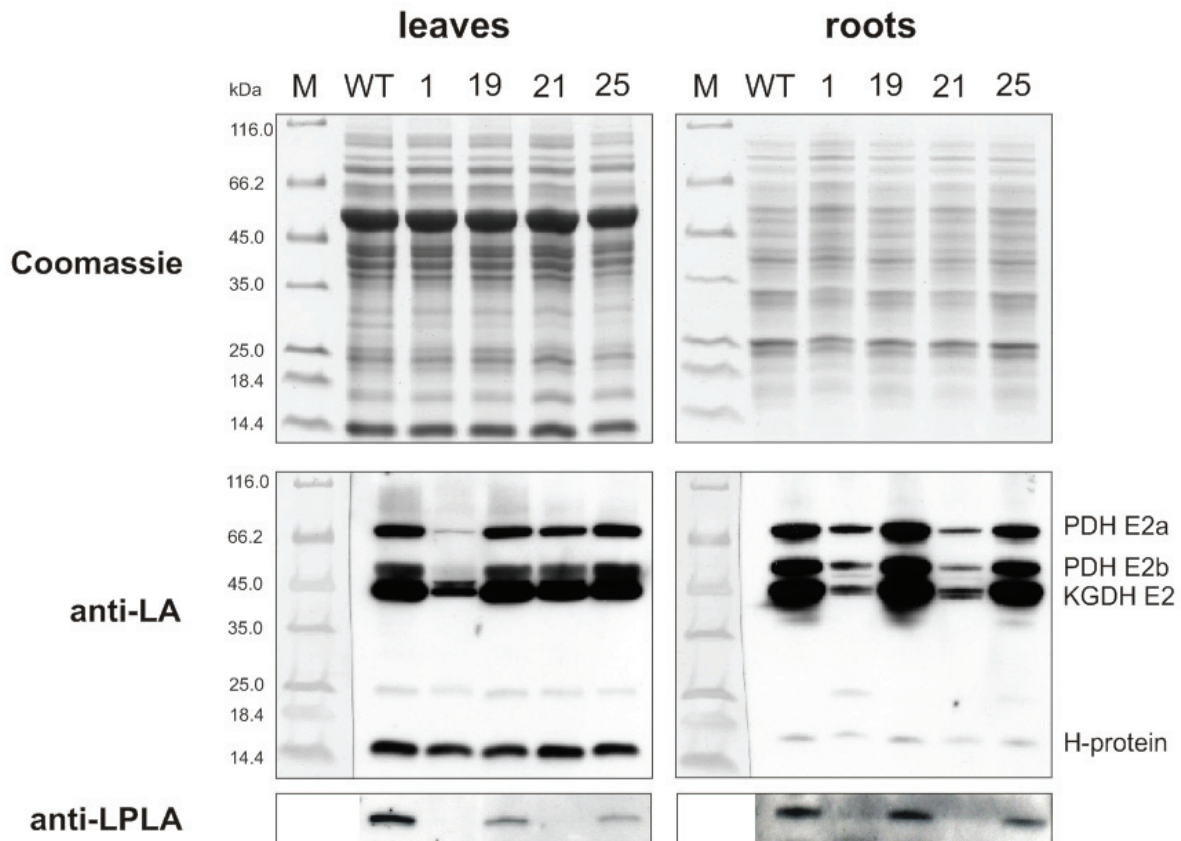


Abbildung 3.27 Lipoylierungsmuster von Blatt- und Wurzelproteinen der ALPLA-RNAi-Linien

Western Blots mit LA-Antiserum (anti-LA) von je 10 µg Blattprotein bzw. je 5 µg Wurzelprotein der AtLPLA-RNAi-Linien 1, 19, 21, 25 und dem korrespondierenden Wildtyp. Zum Nachweis der AtLPLA-Reduktion wurden die Western Blots mit *stripping buffer* behandelt und mit dem AtLPLA-Antikörper (anti-LPLA) reinkubiert. Als Kontrolle des Auftrags gleicher Proteinmengen wurden analoge 12%ige Tricin-SDS-Gele mit Coomassie gefärbt.

Zur Absicherung der Annahme, dass die Liponsäure-Gehalte und nicht die Menge der Apoproteine in den AtLPLA-RNAi-Linien reduziert vorlagen, wurde ein *in vitro* Lipoylierungsansatz mit 10 µg Blattextrakt der Linie 1 und des WT mit 2,5 µg *E. coli* LPLA angefertigt (analog zu 2.2.17). Anhand des Lipoylierungsmusters des Blattextraktes der Linie 1 nach der LPLA-Behandlung war ersichtlich, dass die Apoproteine der KGDH und PDH E2-Untereinheiten im nahezu gleichen Maße wie im WT vorlagen. Die reduzierten Banden im Western Blot mit dem LA-Antikörper (Abbildung 3.28) resultierten demzufolge aufgrund verringerter Gehalte an gebundener Liponsäure und nicht aufgrund verringerter Proteingehalte.

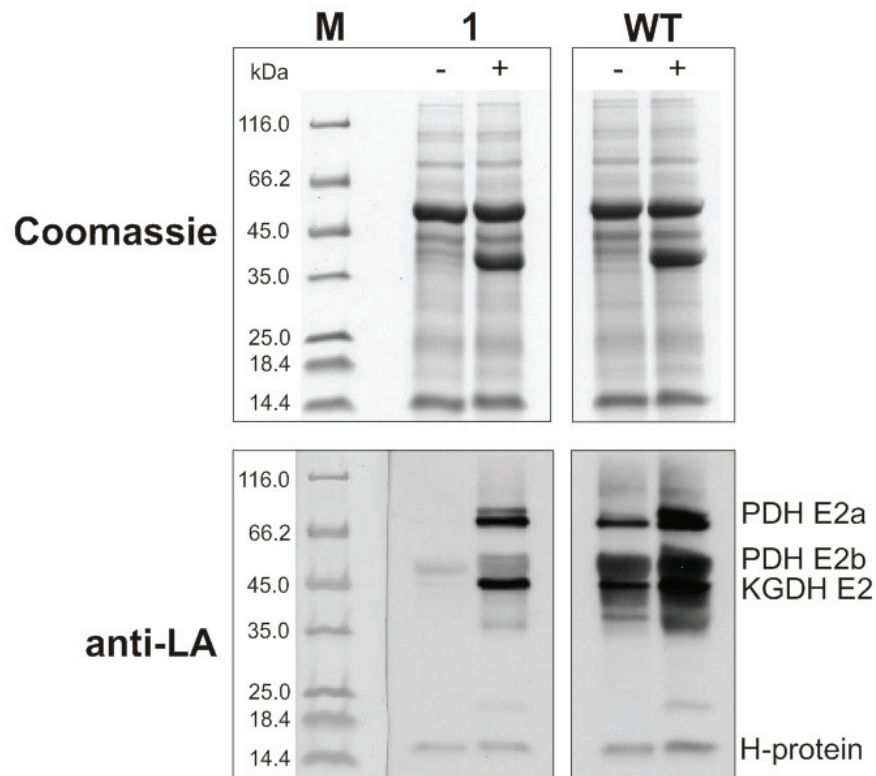


Abbildung 3.28 *In vitro* Lipoylierung von Blattproteinextrakt der AtLPLA-RNAi-Linie 1 und des WT mit *E. coli* LPLA

Je 10 µg Blattextrakte von Linie 1 (1) und Wildtyp (WT) wurden mit (+) bzw ohne (-) 2,5 µg *E. coli* LPLA, LPLA-Puffer, LA und ATP für 16 h bei 28°C inkubiert und auf 12%ige Tricin-SDS-Gele geladen. Diese Gele wurden entweder als Ladekontrolle mit Coomassie gefärbt bzw. für Western Blot Analysen mit einem Antiserum gegen LA (anti-LA) verwendet.

3.3 Mitochondriale Proteinlipoylierung – Interaktion des Liponsäure-Biosyntheseweges und der Photorespiration

3.3.1 Expressionsanalysen der mitochondrialen Lipoyl-Transferase

Die Octanoyl-acyl carrier protein (ACP):protein N-octanoyltransferase (LIP2) katalysiert die Übertragung der am ACP gebundenen Octanoyl-Gruppe, welche durch die mtKAS synthetisiert wird (Yasuno et al., 2004), auf die E2-Untereinheiten der PDH, KGDH, BCDH und des H-Proteins der Glycinderboxylase. Der photorespiratorische Phänotyp der mtKAS Knock-out-Pflanzen mit dem Befund, dass diese Pflanzen ein nahezu vollständig unlipoyliertes H-Protein besitzen, im Gegensatz dazu aber lipoylierte E2-Untereinheiten von rund 20-40 %, impliziert eine engere Verbindung des Liponsäure-Biosyntheseweges und des pflanzlichen C₂-Zyklus.

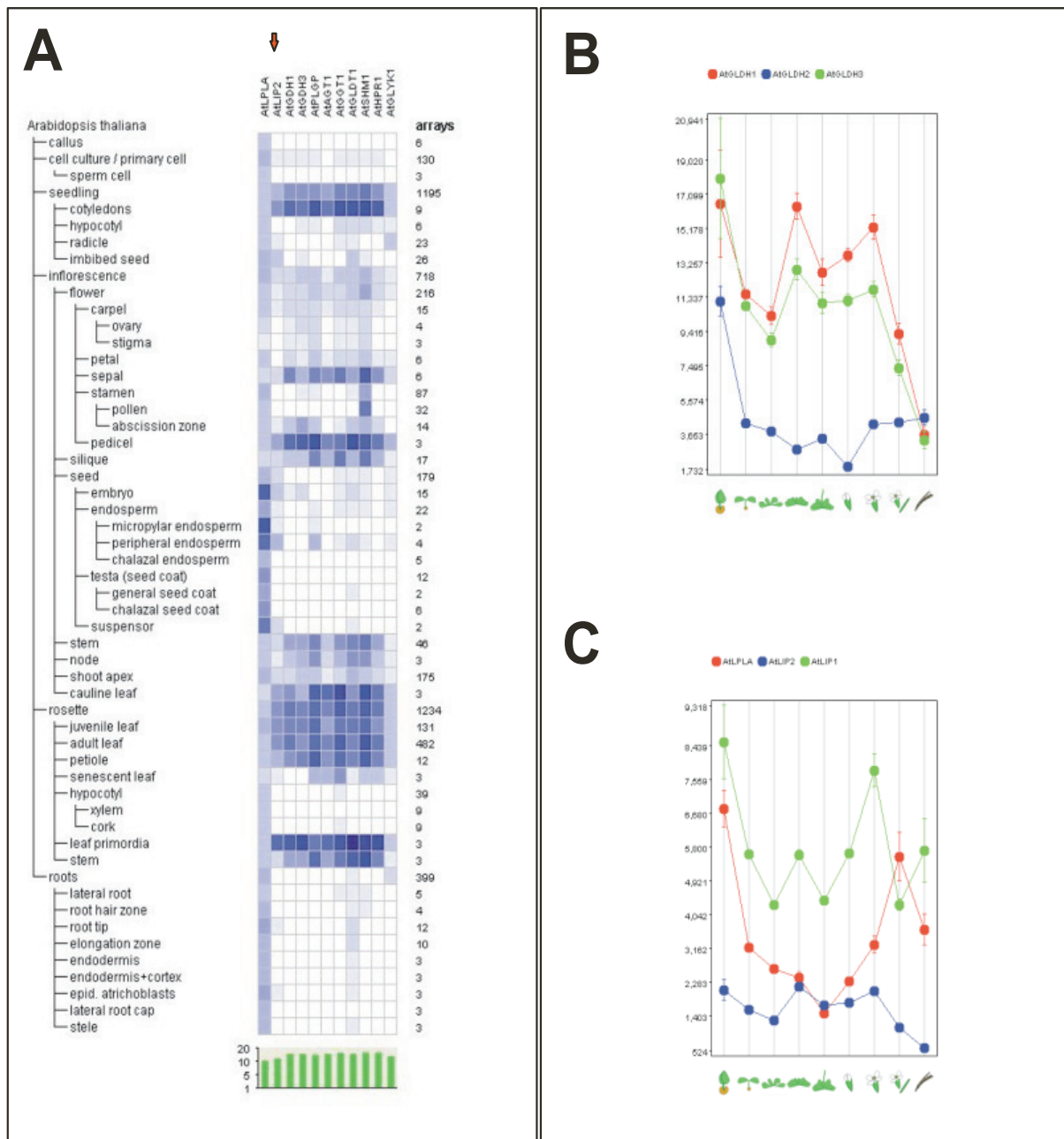


Abbildung 3.29 Transkriptionsstärken von LIP2 (roter Pfeil), AtLPLA und Genen photorespiratorischer Enzyme (Genevestigator).

A: Expressionsstärken in verschiedenen pflanzlichen Geweben. B, C: Expression der H-Protein Gene sowie mitochondrialer Enzyme des Liponsäure-Metabolismus während der pflanzlichen Entwicklung.

Gene: AtLPLA (Lipoat-protein Ligase A At3g29010), AtLIP2 (Lipoyl-Transferase At1g04640), AtGLDH1 (H-Protein1 At2g35370), AtGLDH2 (H-Protein2 At2g35120), AtGLDH3 (H-Protein3 At1g32470), AtPGLP (2PG-Phosphatase At5g36700), AtAGT1 (Ser:Glx Aminotransferase At2g13360), AtGGT1 (Glu:Glx Aminotransferase At1g23310), AtGLDT1 (T-Protein At1g11860), AtSHM1 (Ser-hydroxymethyltransferase At4g37930, AtHPR1 (Hydroxypyruvat Reduktase At1g68010), Glycerat Kinase At1g80380), AtLIP1 (mitochondriale Lipoat-Synthase At2g20860)

Gene der Photorespiration weisen eine enge Co-Regulation auf (Reumann and Weber, 2006; Foyer et al., 2009). Im Genom von *Arabidopsis* existieren drei Gene, welche

verschiedene Isoformen des H-Proteins verschlüsseln. Zwei dieser Gene (At2g35370 AtGLDH1 und At1g32470 AtGLDH3) sind Mitglieder der photorespiratorisch co-regulierten Gene. Das dritte H-Protein wird stärker in Wurzeln, Reproduktionsorganen und heterotrophen Geweben exprimiert und scheint eine wichtige Rolle im C₁-Metabolismus in diesen Geweben einzunehmen (Rajinikanth et al., 2007).

In silico Untersuchungen von elektronischen Northern Daten photorespiratorischer Gene im Vergleich zu Genen des mitochondrialen Liponsäure-Metabolismus mit den Programmen Genevestigator (Abbildung 3.29) und BAR ergaben, dass LIP2 eine enge Co-Regulation zu photorespiratorischen Enzymen aufweist. Speziell das H-Protein1 (At2g35370) sowie die 2-PG-Phosphatase (At5g36700) zeigen hohe *r-value* Werte (Toufighi et al., 2005) von 0,822 bzw. 0,814 (BAR expression angler). Im Gegensatz zur LIP2 zeigt die AtLPLA keinerlei Analogien im Expressionsmuster zu Genen des C₂-Zyklus. Die AtLPLA wird in allen Organen ähnlich stark exprimiert, weist jedoch speziell in embryonalen Geweben verstärkte Transkriptmengen auf (Abbildung 3.29).

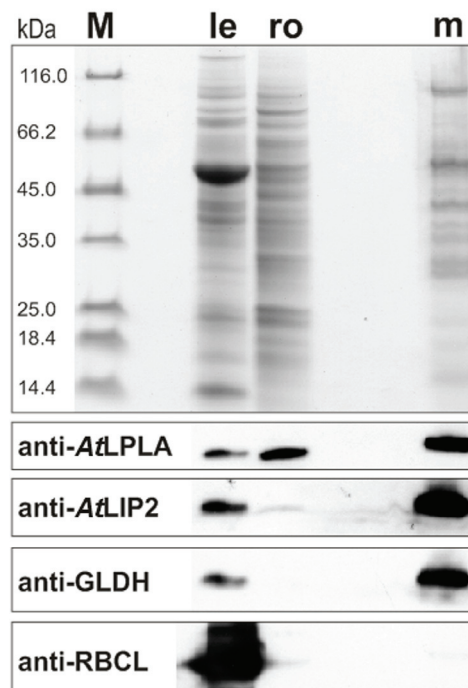


Abbildung 3.30 Im Gegensatz zur AtLPLA wird LIP2 vorrangig im Blatt exprimiert

Jeweils 10 µg Proteinextrakt von Mitochondrien (m), Blättern (le) und Wurzeln (ro) wurden auf SDS-Gele aufgetragen und entweder mit Commassie (oben) gefärbt bzw. für Western Blot Studien auf eine PVDF-Membran geblottet. Dieselbe Membran wurde mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 7.4). Hierbei dienten ein H-Protein Antikörper (anti-GLDH) sowie ein Rubisco Antikörper (anti RBCL) als Kontrolle für den Auftrag reiner Blattmitochondrien.

Aufgrund des Fehlens von Daten zur Expressionstärke der LIP2 in verschiedenen Geweben auf Proteinebene wurden Western Blot Studien mit einem, in dieser Arbeit hergestellten, Antiserum gegen LIP2 angefertigt. Hierzu wurden je 10 µg Blatt-, Wurzel, und Blattmitochondrienprotein auf SDS-Gele aufgetragen. Aus dem Western Blot (Abbildung 3.30) wurde ersichtlich, dass LIP2 im Gegensatz zur AtLPLA hauptsächlich in Blättern translatiert wird. In Wurzelproteinextrakten konnte nur eine schwache Bande detektiert werden. Dieser Befund lieferte einen weiteren Beleg für die vorrangige Bedeutung des Liponsäure-Biosyntheseweges in *Arabidopsis* Blättern.

3.3.2 Mitochondriale *Arabidopsis* Blattproteine, mit Ausnahme des H-Proteins, sind nicht vollständig lipoyliert

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Proteine in Blattmitochondrien vollständig als lipoylierte Holoproteine vorliegen oder gegebenenfalls teilweise als Apoproteine, wurden Wildtyp-Blattmitochondrien mit der funktionstüchtigen Lipoat-protein Ligase A aus *E. coli* behandelt (2.2.17).

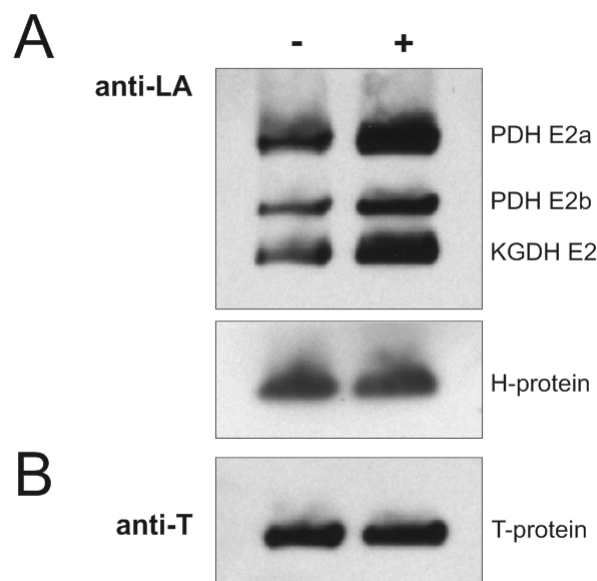


Abbildung 3.31 Die Zugabe der EcLPLA führt zu keiner Veränderung im Liponsäure-Gehalt des H-Proteins, erhöht jedoch die Gehalte gebundener Liponsäure der E2-Untereinheiten der PDH und KGDH.

Extrakte von gereinigten *Arabidopsis* Mitochondrien wurden mit *E. coli* LPLA, ATP und LA inkubiert. Aliquots von unbehandelten (-) bzw. LPLA-behandelten (+) Matrixextrakten wurden mittels Western Blot mit LA-Antikörper nach SDS-PAGE auf den Gehalt von gebundener LA überprüft (A). Als Kontrolle des Auftrags gleicher Proteinmengen wurde die Membran nach Behandlung mit *stripping buffer* mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch für das T-Protein der GDC reinkubiert (B).

Hierzu wurde Mitochondrien-Matrixextrakt mit Liponsäure, ATP und EcLPLA inkubiert und mittels Western Blot Analysen die Gehalte gebundener LA nachgewiesen. Durch densitometrische Auswertung konnte belegt werden, dass ca. 25 % der E2-Untereinheiten der PDH und KGDH als unlipoylierte Apoproteine vorliegen (Abbildung 3.31). Im Gegensatz dazu hatte die EcLPLA-Behandlung keinen Einfluss auf den Lipoylierungsstatus des H-Proteins. Frühere Studien (Hasse et al., 2009) und *in vitro* Ansätze dieser Arbeit (Abbildung 3.20) zeigten, dass die LPLA aus *E. coli* pflanzliche H-Proteine vollständig lipoyliert, wodurch die Möglichkeit einer Enzym-Substrat Diskriminierung ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass nur das H-Protein in Blattmitochondrien vollständig lipoyliert vorliegt. Die enge Co-Regulation des Liponsäure-Biosyntheseweges sowie die vollständige Lipoylierung des H-Proteins ließen die Schlussfolgerung zu, dass eine bevorzugte Lipoylierung des H-Proteins durch die LIP2 in Blattmitochondrien existiert.

Diese Schlussfolgerung konnte in letzter Zeit durch die vorläufigen Untersuchungen von H-Protein Überexpressionspflanzen (Dr. Stefan Timm, PUR, bisher unveröffentlichte Daten) bekräftigt werden. In diesen Untersuchungen wurden die Liponsäure-Gehalte der Blattproteine von Arabidopsispflanzen, in denen das *Flaveria pringlei* H-Protein überexprimiert wurde, mit den LA-Gehalten von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzenproteinen verglichen. In Linie 17, in der eine vielfache Menge an H-Protein vorliegt (Abbildung 3.32, anti-H), ist im Western Blot mit dem LA-Antikörper zu erkennen, dass diese gesteigerten Mengen an H-Protein auch größtenteils lipoyliert vorliegen. Zu welchem Teil das H-Protein in Linie 17 eventuell noch als unlipoyliertes Apoprotein vorliegt müssen weitere Untersuchungen klären. Eine interessante Erkenntnis jedoch, die aus diesem Blot gewonnen werden konnte ergab der Vergleich der Banden der mitochondrialen PDH und KGDH E2-Untereinheiten. Der Vergleich von Proben des Wildtyps und Linie 17 derselben Tageszeit lässt eine eindeutige Reduktion der Liponsäure-Gehalte der mitochondrialen E2-Untereinheiten erkennen. Hingegen weist die Bande, welche der plastidären PDH E2-Untereinheit (LTA2) zugeordnet werden kann (Anhang 7.2.2), keine signifikanten Veränderungen auf. Die Bande der mitochondrialen PDH E2b war aufgrund der geringen Proteinmengen nicht erkennbar.

Die Erkenntnis aus diesen vorläufigen Untersuchungen H-Protein überexprimierender Pflanzen ist zum einen, dass die Menge an mitochondrialer Liponsäure begrenzt zu sein scheint. Zum anderen wird die Liponsäure vorrangig für die Lipoylierung des H-Proteins genutzt, was wiederum zu einer Verringerung der Proteinlipoylierung der mitochondrialen E2-Untereinheiten führt.

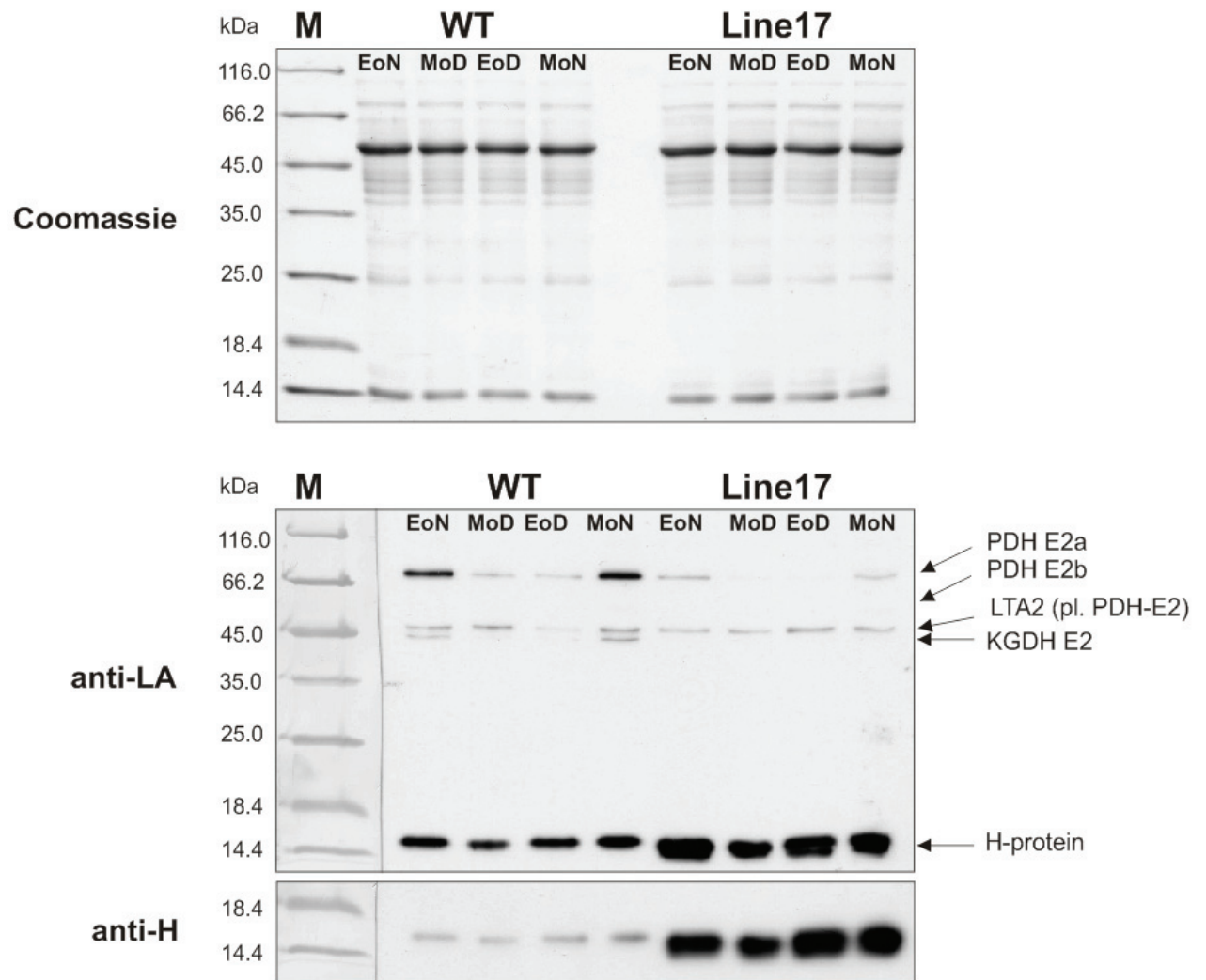


Abbildung 3.32 Lipoylierungsstatus von H-Protein-überexprimierenden Arabidopsispflanzen im Vergleich zum Wildtyp.

Je 3 μ g Blattproteinextrakt von Wildtyp- und H-Protein-überexprimierenden Pflanzen (Linie 17), geerntet zu verschiedenen Tageszeiten (Ende der Nacht EoN, Mitte des Tages MoD, Ende des Tages EoD, Mitte der Nacht MoN), wurden mittels SDS-PAGE separiert und die Gele entweder Coomassiegefärbt (oben) oder für Western Blots mit einem Liponsäure-Antikörper (anti-LA) bzw. mit einem H-Protein-Antikörper (anti-H) verwendet.

3.3.3 Untersuchungen der Rolle des mitochondrialen Liponsäure-Biosyntheseweges im pflanzlichen Stoffwechsel mittels Knock-out-Mutanten

Bisher konnte gezeigt werden, dass im Mitochondrium von *Arabidopsis* beide notwendigen Enzyme, eine Lipoyl-Transferase und eine Lipoat-Synthase, zur Proteinlipoylierung via Biosynthese vorhanden sind. Durch Komplementationsversuche von *E. coli* Mutanten wurde die Funktionalität beider Enzyme bestätigt (Yasuno and Wada, 1998; Wada et al., 2001a). Welche Rolle bzw. Notwendigkeit der mitochondriale Liponsäure-Biosyntheseweg im pflanzlichen Organismus einnimmt, blieb aber bis dato ungeklärt.

Die Untersuchung dieser Fragestellung sollte mit Hilfe von *Arabidopsis* Knock-out-Mutanten erfolgen. In den Datenbanken (z. B. <http://atidb.org>) wird nur eine Mutante (SAIL_1290b_A01.v1) mit einer T-DNA im Gen von LIP1 (At2g20860) angegeben. Diese Mutante ist jedoch in den Listen der Stockcenter (NASC, ABRC) nicht aufgeführt bzw. nicht verfügbar. Aus diesem Grund konnten keine Knock-out-Mutanten von LIP1 untersucht werden.

Für die Untersuchung von LIP2 T-DNA-Insertionsmutanten wurden die Linien SAIL_662_H11 und SAIL_1229_F08 bei NASC bestellt. Trotz umfangreicher Bemühungen mit verschiedenen Primerkombinationen konnte keine Insertion an angegebener Stelle in Pflanzen der Linie SAIL_1229_F08 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Insertion in Linie SAIL_662_H11 (*lip2-1*) an angegebener Position konnte mittels PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt werden. Allerdings war die amplifizierte Bande (Abbildung 3.33 B) um ca. 250 bp kleiner als das zu erwartende Fragment (1518 bp). Die Auswertung der Sequenzierung des PCR-Fragments ergab, dass die *left border* der T-DNA um eben diese ca. 250 bp verkürzt vorliegt.

Über 60 Nachkommen heterozygoter *lip2-1*-Pflanzen wurden auf die Zygote der T-DNA überprüft. Homozygote Pflanzen konnten nicht selektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Schoten heterozygoter *lip2-1*-Pflanzen auf deformierte Samen überprüft. Etwa ein Viertel dieser Samen waren kleiner als die normalen Samen, in jüngeren Schoten hellblass, in älteren Schoten bräunlich und geschrumpft. Nach Entfärben mit Hoyerscher Lösung und mikroskopischer Analyse konnte gezeigt werden, dass der Knock-out der LIP2 in *Arabidopsis* zu einer Embryoletalität führt (Abbildung 3.34 C). Es handelt sich demzufolge um ein essentielles Enzym für die pflanzliche Entwicklung.

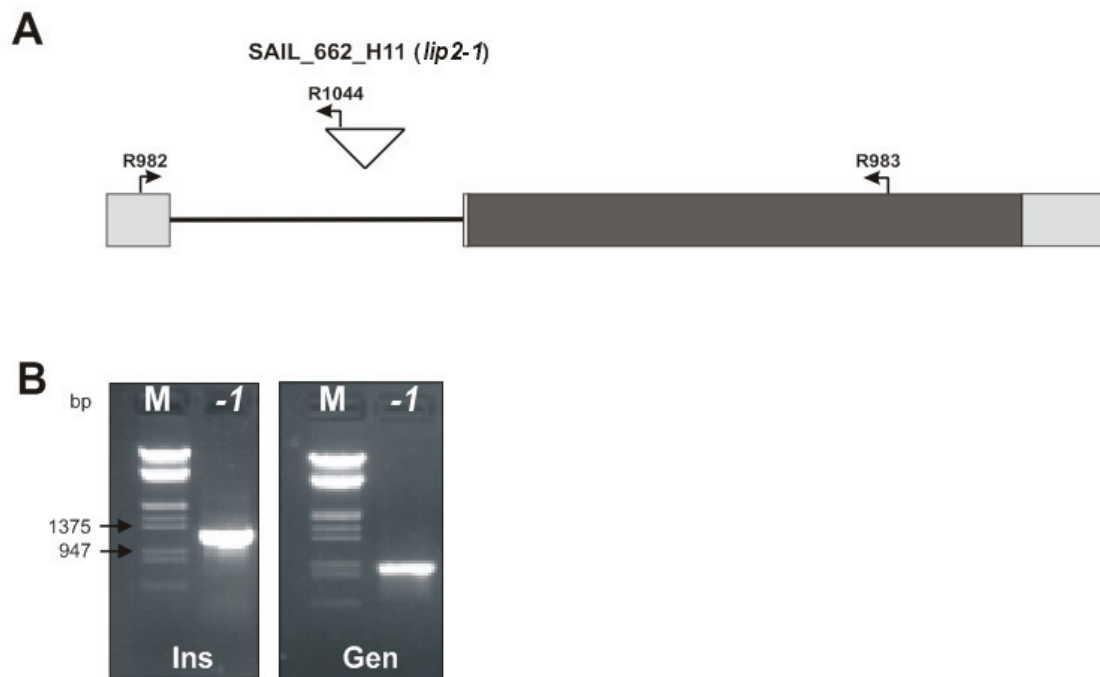


Abbildung 3.33 T-DNA-Insertionslinie *lip2-1* (SAIL_662_H11)

A: Schematische Darstellung der Lage der T-DNA Insertion in Linie SAIL_662_H11 sowie verwendeter Primer. B: Von Linie SAIL_662_H11 konnten keine homozygoten Pflanzen isoliert werden. Die Insertion (Ins) der T-DNA (Primerkombination R982/R1044) sowie die Zygote der T-DNA (Gen, Primerkombination R982/983) wurde mittels PCR nachgewiesen.

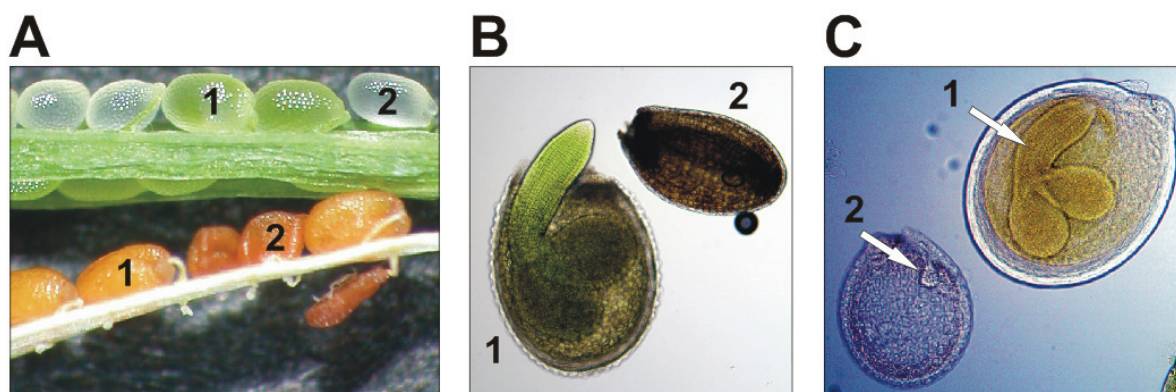


Abbildung 3.34 Der Knock-out der LIP2 führt zu einem embryoletalen Phänotyp

A, B: Mikroskopische Aufnahmen jüngerer (A oben) und älterer (A unten) Schoten und Samen heterozygoter *lip2-1* (SAIL_662_H11) Knock-out-Mutanten. Die Schoten weisen normale (1) und deformierte (2) Samen auf.

C: Die normalen Samen enthalten Embryonen im Kotyledonen-Stadium (1, Pfeil). In den defekten Samen konnten nur unausgebildete Embryonen nachgewiesen werden (2, Pfeil).

3.3.4 Lipoylierungsmuster in LIP2-RNAi-Pflanzen

Im Gegensatz zur LPLA, welche freie Liponsäure/Octansäure zur Proteinlipoylierung nutzt, ist der Liponsäure-Biosyntheseweg von der Verfügbarkeit von Octanoyl-ACP abhängig. Da der Knock-out der LIP2, im Vergleich zum mtKAS Knock-out, wider Erwarten zu einem embryoletalen Phänotyp führte, sollte die Fragestellung der Rolle der LIP2 im pflanzlichen Stoffwechsel mittels RNAi-Linien näher betrachtet werden.

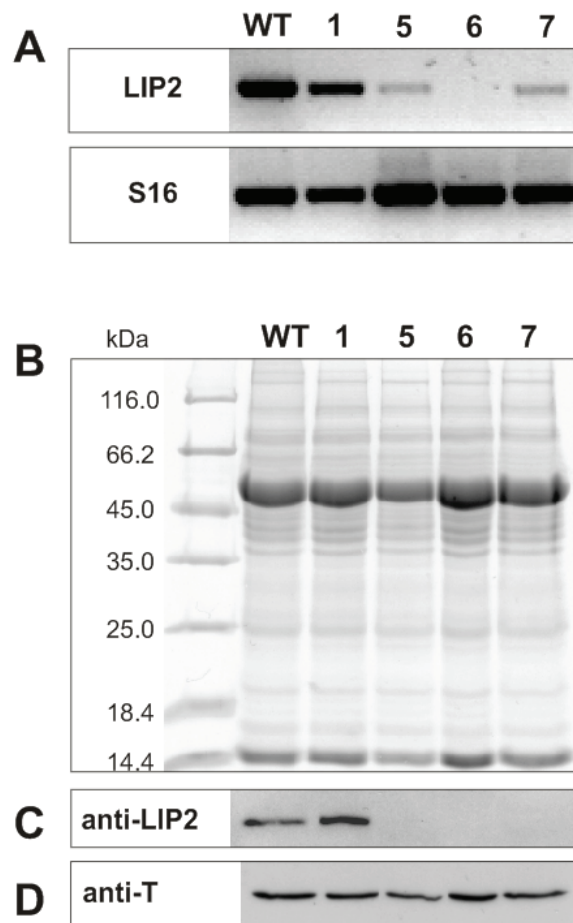


Abbildung 3.35 LIP2-RNAi-Linien zeigen reduzierte LIP2-Gehalte auf Transkript- und Proteinebene

A: RT-PCR zum Nachweis der Blatt LIP2-mRNA-Gehalte in selektierten RNAi-Linien (Primerkombination R982/R983). Die Transkriptgehalte des konstitutiv exprimierten 40S ribosomalen Proteins S16 dienten als Ladekontrolle (Primerkombination R176/R177).

B, C, D: Blatt LIP2-Proteingehalte in RNAi-Linien. Je 10 µg lösliches Protein aus Blattextrakten von Wildtyppflanzen (WT) und RNAi-Linien (1, 5, 6, 7) wurden für eine SDS-PAGE verwendet. B: Coomassie gefärbtes SDS-Gel. C: Immunodetektion mit einem polyklonalen Antiserum gegen LIP2. D: Immunodetektion mit einem Antiserum gegen das T-Protein der GDC als Ladekontrolle.

Für diese Untersuchungen wurden Wildtyppflanzen mit einem RNAi-Konstrukt transformiert (2.2.21) und die positiv selektierten Nachkommen auf die Reduktion von LIP2 und die daraus resultierenden Effekte überprüft. Es konnten mehrere unabhängige RNAi-Linien mit

reduzierten Gehalten an LIP2-Transkript und LIP2-Protein selektiert werden (Abbildung 3.35). Alle Linien zeigten keine visuellen Wachstumsveränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Die stärkste Reduktion der LIP2-Transkriptmengen wies Linie 6 auf. Eine Analyse der Transkriptmenge mittels Real-Time-PCR ergab, dass die Menge der LIP2-mRNA in Linie 6 dem 0,145-fachen der Menge im WT entspricht. Es kann demzufolge angenommen werden, dass eine ebenfalls ca. 85%ige Reduktion der LIP2-Proteinmenge in dieser Linie vorliegt. Mit Hilfe des monoklonalen Antiserums gegen LA wurden die Auswirkungen der LIP2-Reduktion auf die pflanzliche Proteinlipoylierung (Blatt) untersucht.

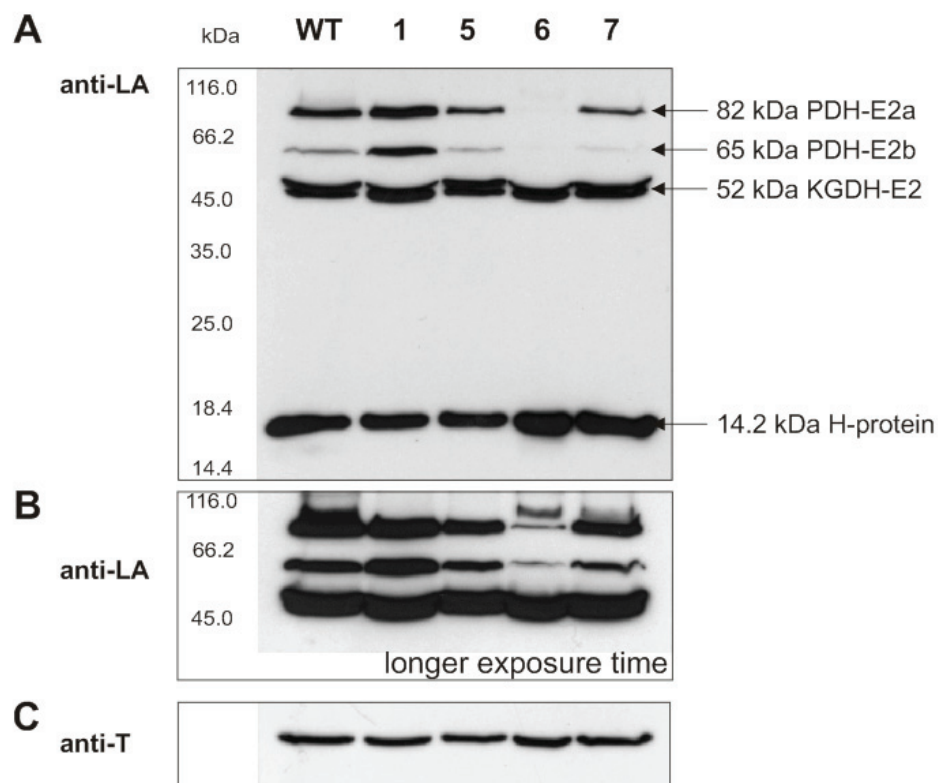


Abbildung 3.36 Die Reduktion der LIP2 vermindert die PDH-E2 Lipoylierung, hat jedoch nur geringe Effekte auf die KGDH und das H-Protein

A, B: Immunodetektion mit anti-LA Antiserum. C: Immunodetektion mit anti-T-Protein Antiserum nach *stripping* als Ladekontrolle.

Diese Untersuchungen ergaben, dass sich die Reduktion der LIP2 in Linie 6 vorrangig auf die Proteinlipoylierung der E2-Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase auswirkt, welche im Gegensatz zum Wildtyp bzw. zu RNAi-Linien mit geringerer LIP2-Reduktion weniger gebundene LA enthalten. Eine Beeinflussung des Lipoylierungsstatus der KGDH und des H-Proteins konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3.36).

3.4 Plastidäre Proteinlipoylierung

3.4.1 Die plastidäre Lipoat-Synthase LIP1p, jedoch nicht die plastidäre Lipoyl-Transferase LIP2p, ist essentiell

Im Jahr 2003 wurde publiziert, dass die plastidäre Pyruvat-Dehydrogenase ein essentielles Enzym für den pflanzlichen Stoffwechsel darstellt (Lin et al., 2003). Der Knock-out der PDH führt zur Embryoletalität. Bisher sind zwei chloroplastidäre Enzyme (LIP1p, LIP2p) bekannt, welche die PDH E2-Untereinheit via Liponsäure-Biosyntheseweg lipoylieren könnten. Ob jedoch weitere Enzyme des Liponsäure-Metabolismus in den Plastiden existieren bzw. ob der plastidäre Liponsäure-Metabolismus, wie angenommen, vollständig autonom ist, war bisher noch unklar. Wenn homozygote Mutationen von LIP1p und LIP2p ebenfalls zu letalen Effekten führen würden, könnte eine Redundanz im chloroplastidären LA-Stoffwechsel ausgeschlossen werden.

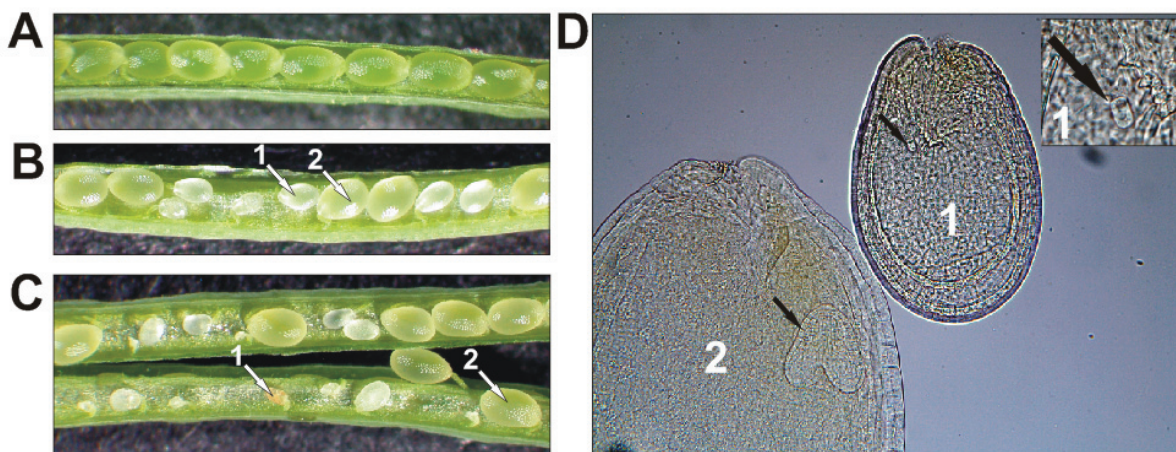


Abbildung 3.37 Der Knock-out der LIP1p resultiert in einem embryoletalen Phänotyp

Mikroskopische Aufnahmen von jüngeren (B) und älteren (C) Schoten heterozygoter *lip1p-1* Knock-out-Mutanten sowie von Wildtypschoten (A). Die *lip1p-1* Schoten beinhalten normale grüne (2) und anfangs kleinere blass-weiße, später geschrumpfte bräunliche (1) Samen. Die Samen heterozygoter *lip1p-1* Mutanten wurden mit Hoyerscher Lösung entfärbt (D). In den normalen Samen sind Embryonen im Herzblattstadium (2, Pfeil) nachweisbar, hingegen konnten in den defekten Samen nur verkümmerte Embryonen (1, Pfeil) nachgewiesen werden.

Deshalb wurden T-DNA Insertionslinien für jedes der beiden Gene (LIP1p, At5g08415 SALK_024724; LIP2p, At4g31050 SALK_085456 und SALK_031372) untersucht (Abbildung 3.47). Diese Analysen ergaben, dass die homozygote Mutation (Linie SALK_024724 *lip1p-1*) von LIP1p in einer Embryoletalität resultiert, was darauf hindeutet, dass die Lipoylierung der plastidären PDH-E2 Untereinheit auf der Bereitstellung mit Octanoyl-Einheiten basiert. Gäbe

es eine Versorgung mit fertigen Lipoyl-Einheiten aus dem Mitochondrium, so könnte dieser Weg umgangen werden.

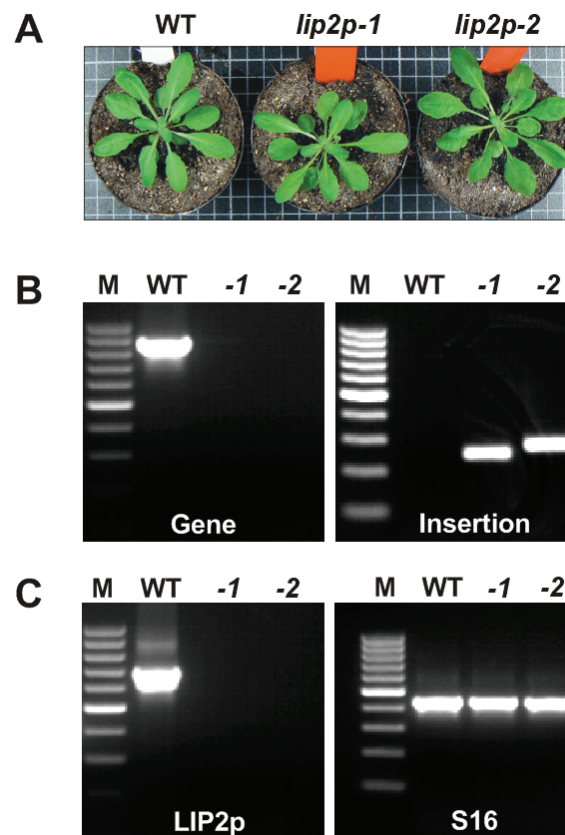


Abbildung 3.38 Isolation von homozygoten *Arabidopsis* LIP2p T-DNA-Insertionsmutanten

A: LIP2p Knock-out-Mutanten weisen keine Veränderung zu Wildtyppflanzen auf. B: Die PCR mit genomischer DNA zeigt das Vorhandensein des intakten LIP2p-Gens im Wildtyp (WT), fehlt jedoch in beiden homozygoten LIP2p T-DNA-Linien SALK_031372 (-1) und SALK_085456 (-2). Zum Nachweis des intakten LIP2p-Gen (Gene) wurde die Primerkombination R1001/R1014, zum Nachweis der Insertion R1014/R741, verwendet.

C: RT-PCR, zum Nachweis des Fehlens des LIP2p-Transkripts in den homozygoten Pflanzen SALK_031372 (-1) und SALK_085456 (-2) und dessen Präsenz im Wildtyp (WT). Die verwendeten Primer waren R1001 und R1014 sowie R176/R177 als Kontrolle für intakte cDNA (M, Marker 100 bp ladder Fermentas)

Erstaunlicherweise zeigte keine der beiden unabhängigen LIP2p-Nullmutanten (SALK_031372 *lip2p-1* und SALK_085456 *lip2p-2*) sichtbare Effekte bzw. Veränderungen zum Wildtyp.

3.4.2 Identifikation und Expression der *Arabidopsis* Lipoyl-Transferase LIP2p2

Da die homozygoten LIP2p T-DNA-Insertionsmutanten keinerlei sichtbare Veränderungen zu Wildtyppflanzen aufwiesen, lag die Vermutung des Vorhandenseins weiterer Enzyme mit

gleicher Funktion im Chloroplasten nahe. Aus diesem Grund wurde in den Datenbanken nach ähnlichen Aminosäuresequenzen zur LIP2p (At4g31050) gesucht. Die Bezeichnung P0C7R2 (Uniprot; fortan LIP2p2) verschlüsselt ein putativ chloroplastidäres Lipoyl-Transferase ähnliches Protein. Die Aminosäuresequenz, mit ihren 280 AS, weist hohe Übereinstimmungen zu bekannten Lipoyl-Transferasen auf (Abbildung 3.39) und beinhaltet ein putatives 34 AS langes chloroplastidäres Targetpeptid (Emanuelsson et al., 1999) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>).

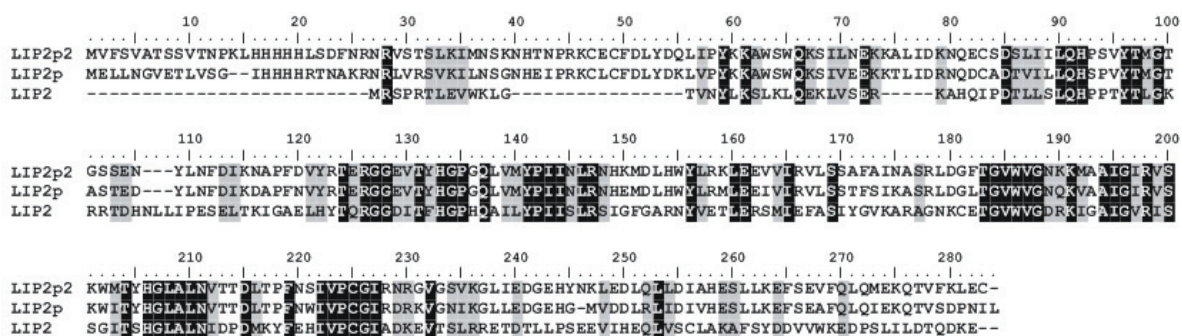


Abbildung 3.39 Aminosäuresequenz-Alignment von *Arabidopsis* Lipoyl-Transferasen

Die Aminosäuresequenzen beginnen mit der N-terminalen Aminosäure des nativen Proteins. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Der korrespondierende *Arabidopsis* Genlocus At1g47580 hingegen sagt eine 416 AS lange Proteinsequenz vorher. Es war jedoch nicht möglich das korrespondierende Transkript in Blatt RNA nachzuweisen, was mit den Befunden früherer Berichte übereinstimmt (Wada et al., 2001b).

Das bisherige Genmodell für At1g47580 basierte auf einer fehlerhaften Vorhersage, weshalb zwei neue Locusnamen zugeteilt wurden (Abbildung 3.40; Anhang 7.2.1), At1g47575 (P0C7R2 *putative lipoyltransferase-like protein*, fortan LIP2p2) und At1g47580 (P0C7R1 *pentatricopeptide repeat-containing protein*).



Abbildung 3.40 Schematische Darstellung der verschiedenen annotierten Exonstrukturen

Die Exonstruktur des fälschlich annotierten Genmodells für At1g47580 ist weiß unterlegt. Die neueren Exonstrukturen von Uniprot P0C7R2 und P0C7R1 sind dunkelgrau bzw. hellgrau gekennzeichnet.

Da elektronische Northern Daten für At1g47575 nicht zur Verfügung standen, wurden die Expressionsraten von LIP2p2 im Vergleich zu LIP2p mittels RT-PCR mit RNA verschiedener Organe als Template näher betrachtet. Transkripte beider Gene waren in allen Organen von *Arabidopsis* nachweisbar, jedoch in unterschiedliche Mengen. Während LIP2 die höchste Expression in Blättern und Wurzeln aufweist, scheint LIP2p2 stärker in Schoten und Blüten transkribiert zu werden (Abbildung 3.41).

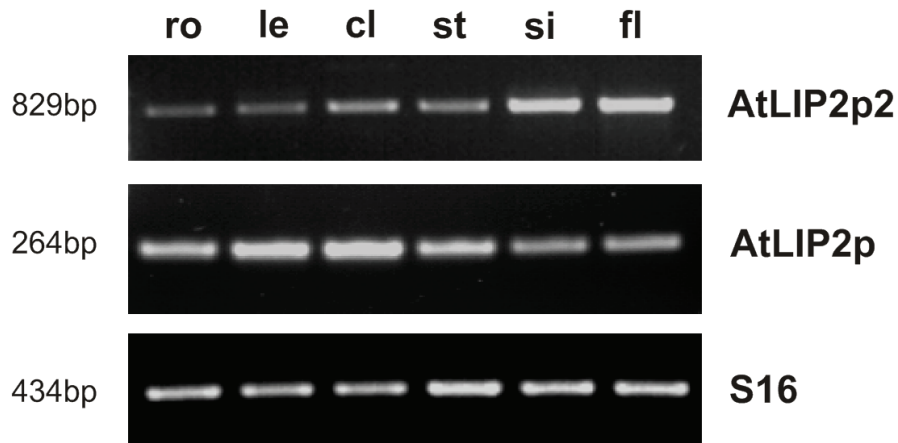


Abbildung 3.41 Organspezifische Expressionsanalysen plastidärer Lipoyl-Transferase-Gene

Die LIP2p2 und LIP2p mRNA-Gehalte wurden mittels RT-PCR mit Gesamt-RNA-Extrakten von Wurzel (ro), Blatt (le), Hochblatt (cl), Stängel (st), Schote (si), und Blüte (fl) analysiert. Die verwendeten Primerkombinationen waren P238/P239 für LIP2p und P211/P229 für LIP2p2. Die RNA Mengen wurden mit Hilfe der Primerkombination R176/R177 für das konstitutiv exprimierte 40S ribosomale Protein (S16) abgeglichen.

Als nächstes wurden die LIP2p2-Proteingehalte in Blättern und Wurzeln und parallel dazu auch in isolierten Chloroplasten (2.2.11) verifiziert, was dem Beweis der vorhergesagten chloroplastidären Lokalisation diene. Das Antiserum für diese Western Blot Analysen wurde gegen das heterolog exprimierte LIP2p2-Protein mit Hilfe von Kaninchen-Immunisierung produziert und aufgereinigt (2.2.14; 2.2.18). Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen mit LIP2p wurden alle Proteinextrakte sowie die Stromaextrakte der gereinigten Chloroplasten aus homozygoten *lip2p-2* Pflanzen isoliert. Als Positivkontrolle wurde ein analoger Blot mit einem Antiserum gegen die plastidäre Glycerat-Kinase (GLYK) mitgeführt. Zur Analyse mitochondrialer Verunreinigungen diene ein Antikörper gegen das mitochondriale T-Protein der Glycin-Decarboxylase.

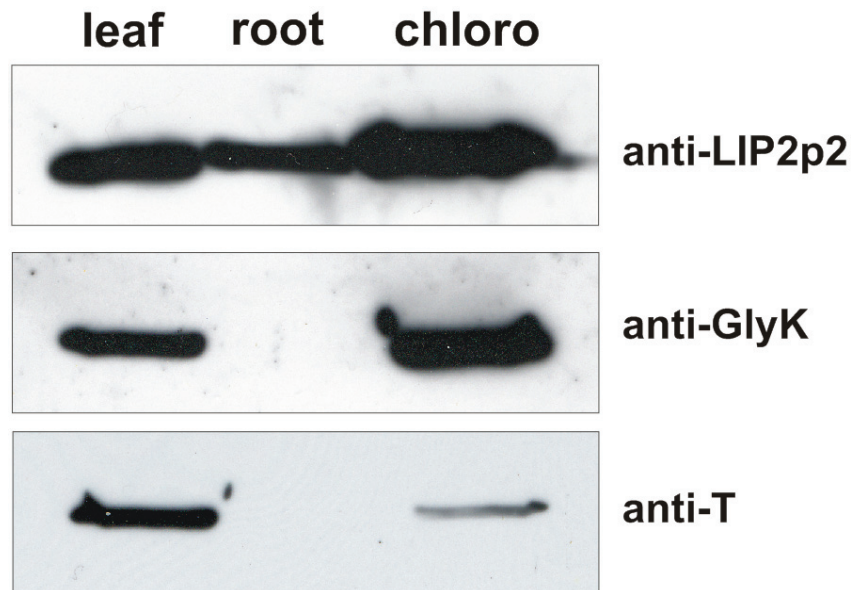


Abbildung 3.42 Western Blot Analysen von LIP2p2 defizienten *Arabidopsis* Proteinextrakten mit einem polyklonalen Antiserum gegen LIP2p2

10 µg Protein von Wurzeln (root), Blättern (leaf) bzw. isolierten Chloroplasten (chloro) wurden durch SDS-PAGE separiert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Als Kontrolle für plastidäre Proteine diente ein Antiserum gegen die Glycerat-Kinase. Für die Detektion mitochondrialer Verunreinigungen wurde ein Antiserum gegen das T-Protein der GDC verwendet.

In Übereinstimmung mit den Transkriptanalysen konnten ähnliche Gehalte von LIP2p2 in Blatt- und Wurzelextrakten detektiert werden. Trotz geringer mitochondrialer Verunreinigungen der isolierten Chloroplasten, welche durch das schwache GDC-T Protein Signal angezeigt wurden, sprach das starke Signal des LIP2p2-Antikörpers deutlich für eine chloroplastidäre Lokalisation von LIP2p2.

Um sicherzustellen, dass LIP2p2 ein chloroplastidäres Transitpeptid trägt, wurden subzelluläre Lokalisationsstudien mit dem Reportergen GFP (*green fluorescent protein*) angefertigt. Hierzu wurden die ersten 246 bp der LIP2p2 cds, welche die ersten 82 N-terminalen Aminosäuren kodieren, in den Vektor pGFP2 kloniert. Mit diesem Vektor wurden Tabakprotoplasten transformiert um zu ermitteln, in welche subzellulären Kompartimente das GFP durch das LIP2p2-Transitpeptid transportiert wird. Die mikroskopischen Aufnahmen bewiesen, dass das GFP durch die Fusionierung mit den ersten 82 AS von LIP2p2 eindeutig in den Chloroplasten lokalisiert ist. In der Kontrolle hingegen, in der die Protoplasten mit dem leeren Vektor transformiert wurden, konnte die Fluoreszenz des GFP nur im Zytosol nachgewiesen werden.

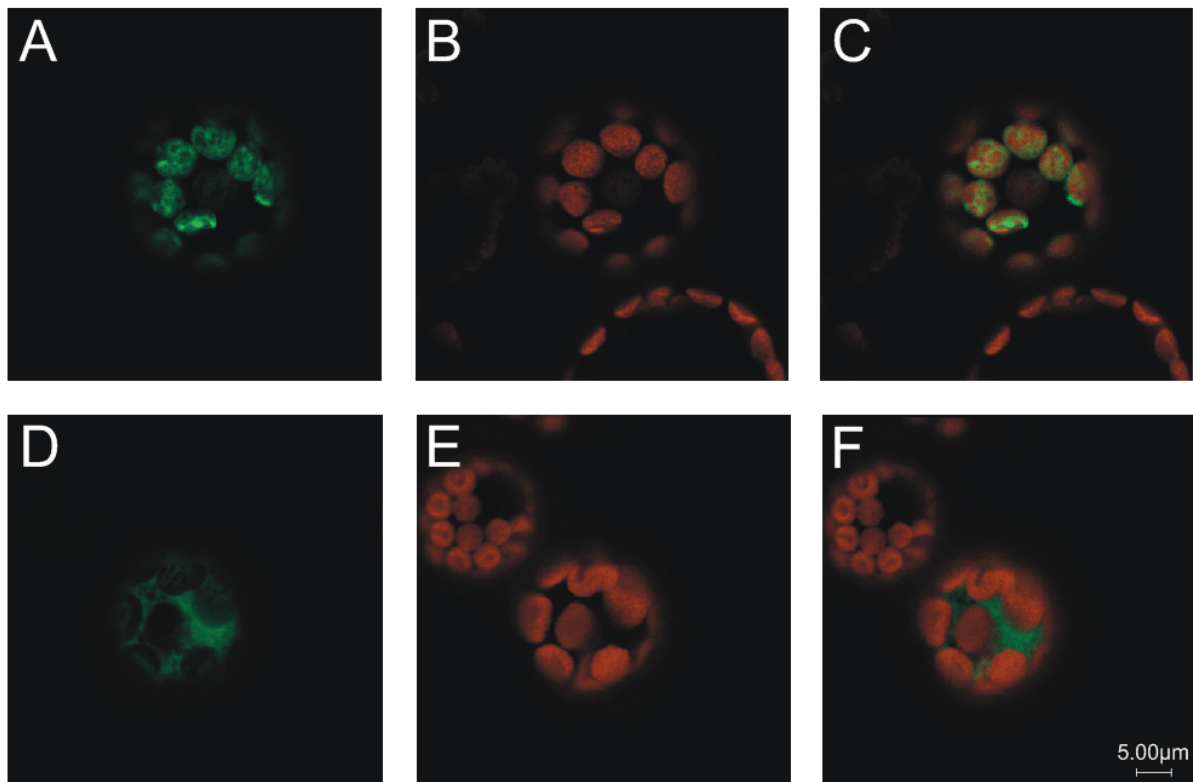


Abbildung 3.43 Subzelluläre Lokalisation von LIP2p2 mittels GFP-Fusionsstudien

Tabakprotoplasten wurden mit dem Plasmid pGFP2-LIP2p2, das die cds der ersten 82 N-terminalen Aminosäuren von LIP2p2 enthielt, transformiert (A, B, C). Der leere Vektor diente als Kontrolle (D, E, F). Die grüne Fluoreszenz des GFP (A, D), die rote Fluoreszenz des Chlorophyll (B, E) und die Kombination von grüner und roter Fluoreszenz wurden mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie detektiert.

3.4.3 LIP2p2-Komplementationsstudien der lipoylierungsdefizienten *E. coli* Mutante TM137

Um die Funktionalität der Octanoyl-Transferase-Aktivität der LIP2p2 zu belegen, wurde die gesamte LIP2p2 verschlüsselnde Nukleotidsequenz in den Expressionsvektor pASK-IBA7plus kloniert. Der mit diesem Konstrukt transformierte *E. coli* TM137 Stamm (Morris et al., 1995) wurde für Komplementationsstudien verwendet. Da TM137 durch einen Knock-out sowohl der LPLA (Lipoat-protein Ligase A) als auch der LIPB (Octanoyl-Transferase) nicht in der Lage ist E2-Untereinheiten liponsäureabhängiger Enzyme zu lipoylieren, benötigt er Acetat und Succinat (Bypass der PDH und KGDH) für ein adäquates Wachstum. Ohne diese Zusätze ist es TM137 nicht möglich, in Minimalmedium zu wachsen. Die Wachstumsversuche auf M9-Minimalmedium-Platten zeigen, dass untransformierte TM137 Zellen sowie Zellen, in die der leere Vektor transformiert wurde, nicht ohne Acetat und Succinat wachsen können (Abbildung 3.44 Sektion B2 vs. C2, Sektion B3 vs. C3).

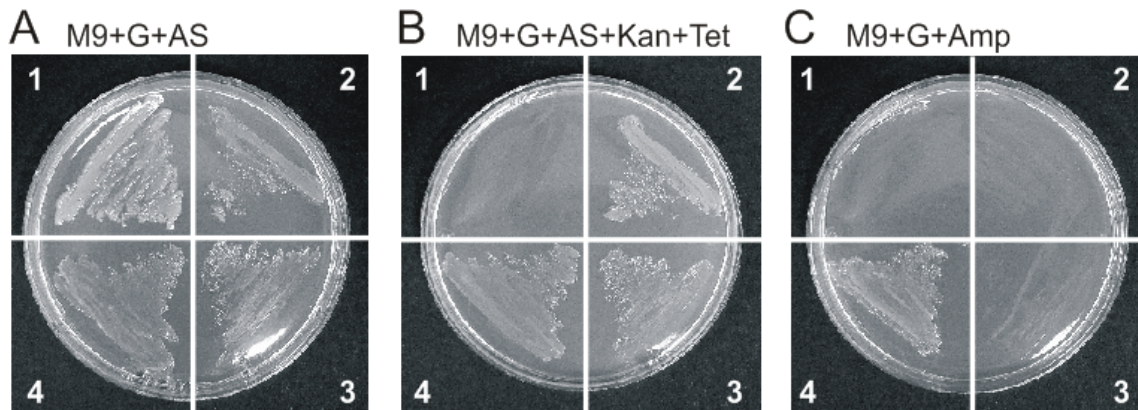


Abbildung 3.44 Genetische Komplementation der *E. coli lipB/lipA* Nullmutante TM137 durch die Expression der LIP2p2 cds

1 – K12 (*E. coli* Wildtyp); 2 – TM137 (*lipB/lipA* Mutante); 3 – TM137 transformiert mit pASK-IBA7plus und 4 – TM137 transformiert mit pASK-IBA7plus/LIP2p2. Die Zellen wurden auf Minimalagar-Platten (M9) mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin ausgestrichen, die verschiedene zusätzliche Substanzen enthielten; 0,4% Glukose (G), 5 mM Na-Acetate (A), 5 mM Na-Succinat (S), 50 µg/mL Kanamycin (Kan), 10 µg/mL Tetracycline (Tet), 50 µg/mL Ampicillin (Amp). Die Platten wurden für zwei Tage bei 37 °C inkubiert.

Die mit pASK-IBA7plus/LIP2p2 transformierten TM137 Zellen hingegen können auf Minimalmedium mit Glukose als einziger C-Quelle wachsen (Abbildung 3.44 Sektion C4). Diese Ergebnisse konnten mit Wachstumsversuchen in flüssigem Minimalmedium mit Glukose, Acetat und Succinat bestätigt werden. Auch in M9-Minimalmedium wuchsen LIP2p2 exprimierende TM137 Zellen wesentlich schneller als untransformierte Zellen bzw. TM137 Zellen, welche nur den nicht-rekombinanten Vektor pASK-IBA7plus enthielten (Abbildung 3.45 oben).

Interessanterweise nährten sich LIP2p2 exprimierende Zellen, welche in LB-Medium wuchsen stärker dem Wachstumsverhalten der Wildtypkontrollzellen (K12) an, als dies bei Kultivierung in Minimalmedium der Fall war. Deshalb wurde in einem analogen Ansatz mit Minimalmedium mit bzw. ohne Liponsäure überprüft, ob LIP2p2 gegebenenfalls Ligase-Aktivität aufweist. Das Ergebnis des 48 Stunden Wachstumstests belegt eindeutig, dass keine Steigerung des Wachstums von mit pASK-IBA7plus/LIP2p2 transformierten Zellen durch die externe Gabe von Liponsäure zu verzeichnen ist (Abbildung 3.46). Somit ist davon auszugehen, dass LIP2p2 keine Ligase-Aktivität besitzt. Das verbesserte Wachstum in LB-Medium könnte aufgrund eines verstärkten Nahrungsangebotes hervorgerufen werden.

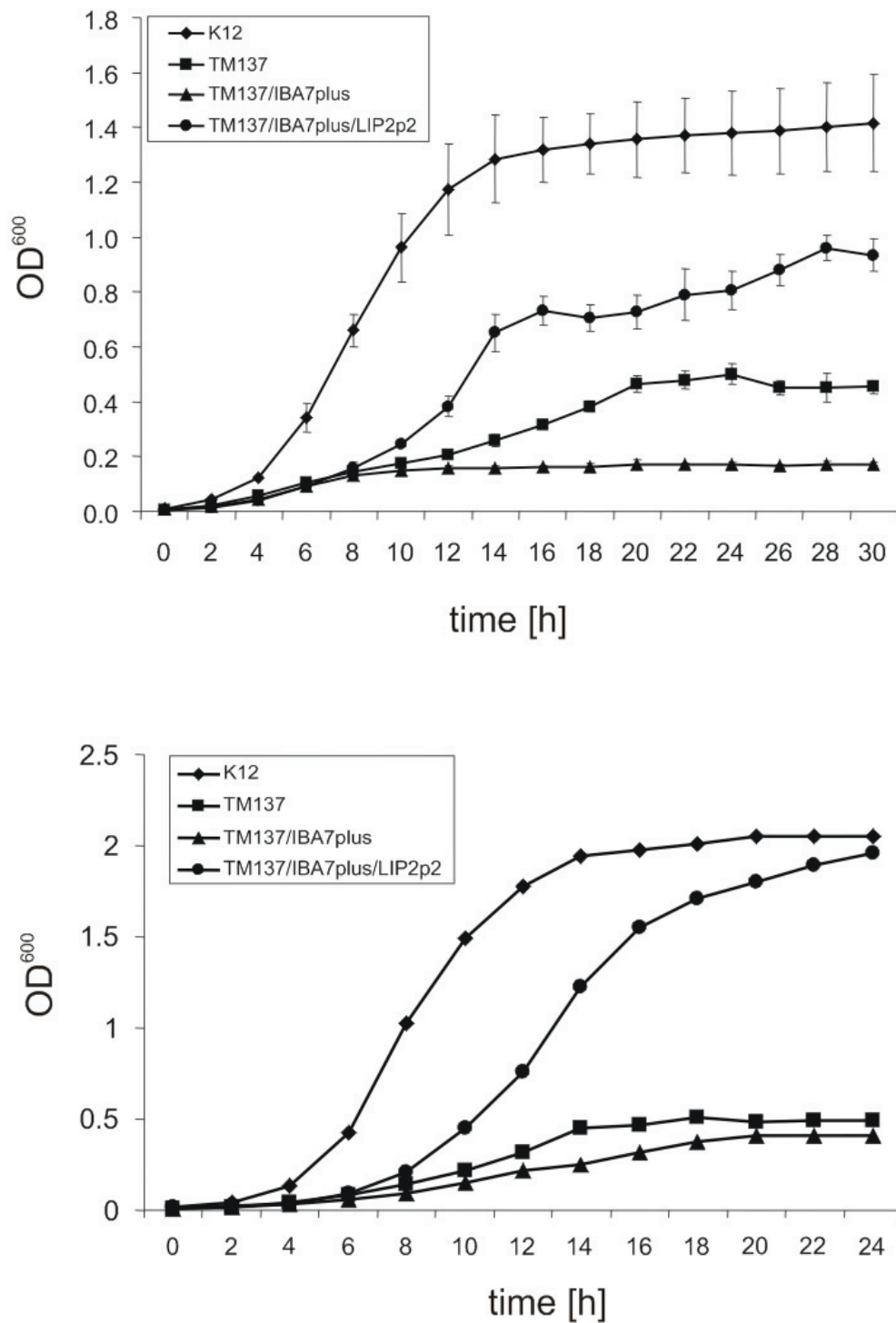


Abbildung 3.45 Wachstum von *E. coli* TM137 Zellen mit und ohne LIP2p2 Komplementation

Die Stämme wurden entweder in Minimal-M9-Glukosemedium (oben) bzw. in LB-Medium (unten) mit Acetat und Succinat bei 37 °C kultiviert. Alle Kulturen wurden durch Zugabe von 200 nmol/ml Anhydrotetracyclin induziert und die OD⁶⁰⁰ alle zwei Stunden vermessen (Standardabweichung: 3 unabhängige Ansätze)

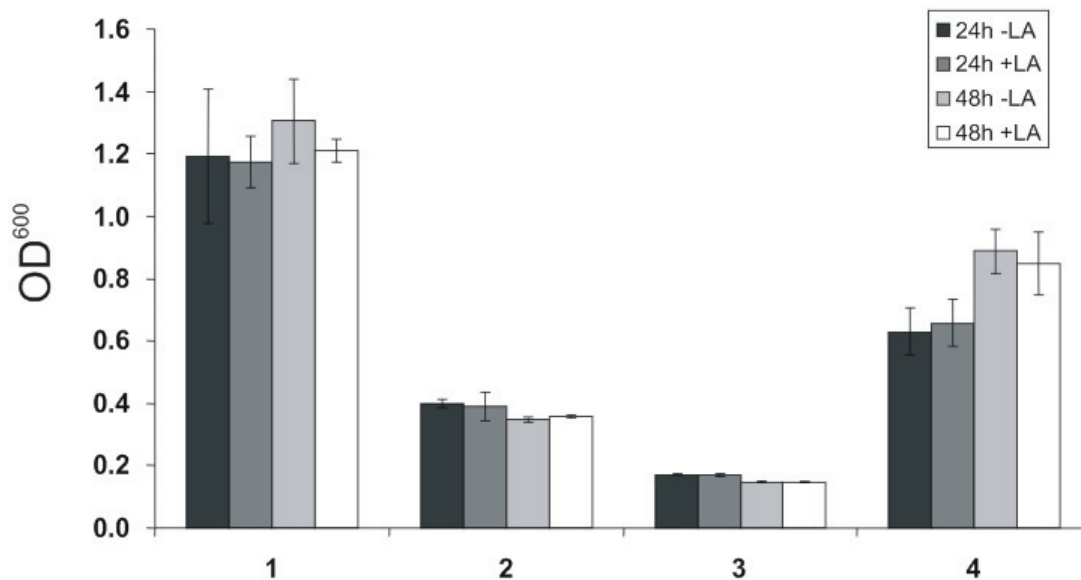


Abbildung 3.46 Wachstumsraten von *E. coli* Stämmen bei 37 °C mit (+LA) und ohne (-LA) 500 ng/ml Lipid A.

Die Stämme wurden in Minimal-M9-Glukosemedium mit Zusatz von Acetat, Succinat und Anhydrotetracyclin kultiviert. Verwendeten Stämme: 1, K12 (Wildtyp); 2 TM137 (*lplA/lipB*); 3 TM137 mit pASK-IBA7plus und 4, TM137 mit pASK-IBA7plus/LIP2p2 transformiert.

3.4.4 LIP2p2 und LIP2p sind redundant in *Arabidopsis*

Die beiden chloroplastidären Lipoyl-Transferasen LIP2p und LIP2p2 werden in allen Organen von *Arabidopsis*, wenn auch in leicht unterschiedlichen Mengen, transkribiert. Somit wurde spekuliert, dass beide Gene redundant sind. Ein Knock-out der LIP2p führt zu keiner sichtbaren Veränderung im pflanzlichen Wachstum. Die Vermutung lag nahe, dass es ebenfalls möglich sein müsste homozygote T-DNA-Insertionslinien von LIP2p2 zu isolieren. Aus diesem Grund wurden mehrere unabhängige T-DNA Linien von dem Stockcenter NASC geordert. In drei dieser Linien (SALK_036960, SALK_118482 und SALK_037156) konnte, trotz umfangreicher Bemühungen, keine Insertion mittels PCR mit einem genspezifischen Primer und einem Primer für die *left border* der T-DNA amplifiziert werden. Einzig in der Linie SALK_038140 (*lip2p2-1*) konnte die Insertion bestätigt werden.

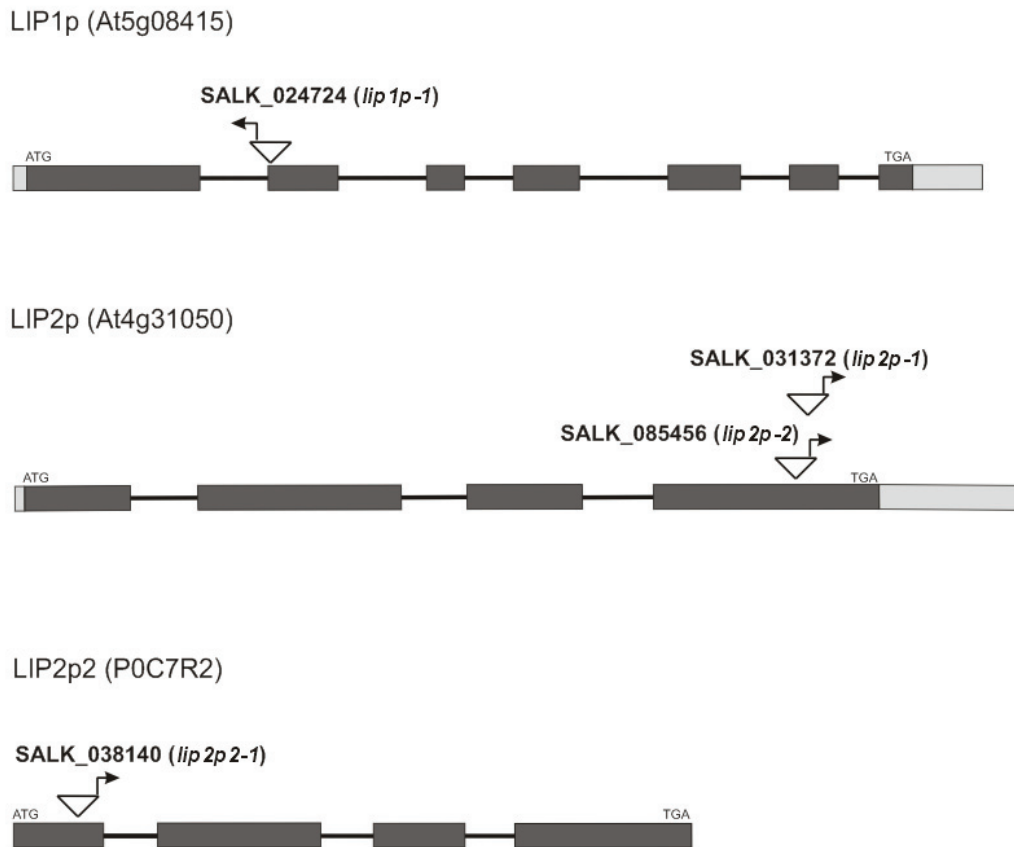


Abbildung 3.47 Positionen der T-DNA untersuchter Linien von Enzymen des plastidären Liponsäure-Metabolismus (schematisch)

Die Sequenzierung des Amplifikats der PCR ergab, dass die Insertion 106 bp (Position bp 97 vom Start-ATG) upstream von der angegebenen Position und somit im ersten Exon von *LIP2p2* liegt. In der F2-Generation der von NASC erhaltenen Samen konnten homozygote Pflanzen für die T-DNA isoliert werden (Abbildung 3.48). Diese Pflanzen weisen ebenfalls keine sichtbaren Veränderungen zu Wildtyppflanzen auf. Dieser Befund bekräftigte die Vermutung, dass sich beide Gene gegenseitig ersetzen können und die Pflanzen somit keinerlei Beeinträchtigungen durch den Ausfall eines der beiden Gene erfahren.

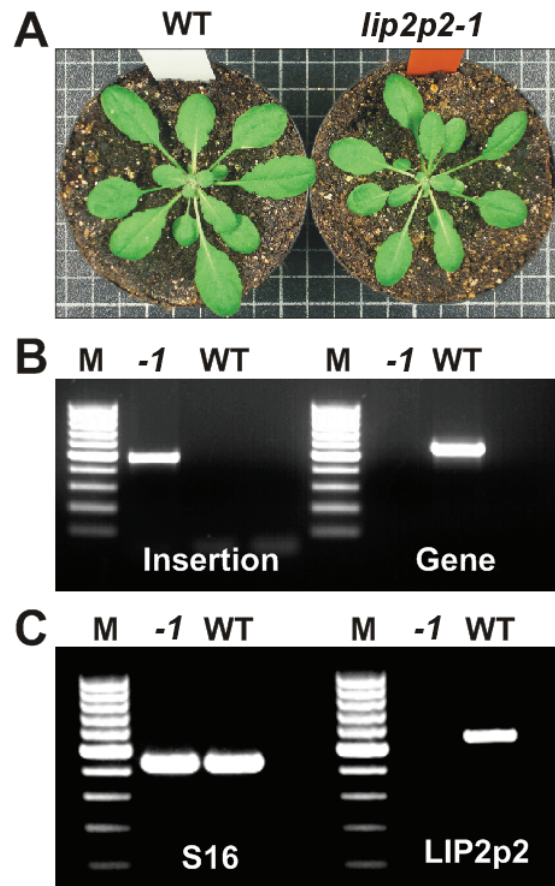


Abbildung 3.48 Isolation von homozygoten LIP2p2 *Arabidopsis* T-DNA-Insertionsmutanten

A: Die LIP2p2 Knock-out-Mutante *lip2p2-1* weist keine Veränderung zu Wildtyppflanzen auf

B: Die PCR mit genomischer DNA zeigt das Vorhandensein des intakten LIP2p2-Gens im Wildtyp (WT), fehlt jedoch in der homozygoten LIP2p2 T-DNA-Linie SALK_038140 (-1). Zum Nachweis des intakten LIP2p2-Gen (gene) wurde die Primerkombinationen P211/P437, zum Nachweis der Insertion P212/R741, verwendet.

C: RT-PCR, zum Nachweis des Fehlens des LIP2p2-Transkripts in SALK_038140 (-1) und dessen Präsenz im Wildtyp (WT). Die verwendeten Primer waren P211 und P230, sowie R176/R177 (S16) als Kontrolle für intakte cDNA (M, Marker 100 bp ladder Fermentas)

Zum entgeltigen Beweis der Theorie, dass die beiden Lipoyl-Transferasen LIP2p und LIP2p2 redundant sind und keine weiteren Enzyme für das Überleben der Knock-out-Mutanten dieser Gene verantwortlich sind, wurden die homozygoten Linien *lip2p-2* und *lip2p2-1* gekreuzt. Pflanzen der F2-Generation wurden auf einen doppelten Knock-out untersucht. Es konnten keine doppelt homozygoten Pflanzen isoliert werden. In den Schoten von homo-/heterozygoten Pflanzen wurden normale und verkrüppelte Samen entdeckt (Abbildung 3.49). Dies war der Beweis dafür, dass der doppelte Knock-out der LIP2p und LIP2p2 zur Embryoletalität führt. Somit konnte gezeigt werden, dass beide plastidäre Lipoyl-Transferasen zusammen essentiell für die Lipoylierung der PDH E2-Untereinheit sind und keine weiteren kompensatorischen Wege in den Plastiden von *Arabidopsis* existieren.

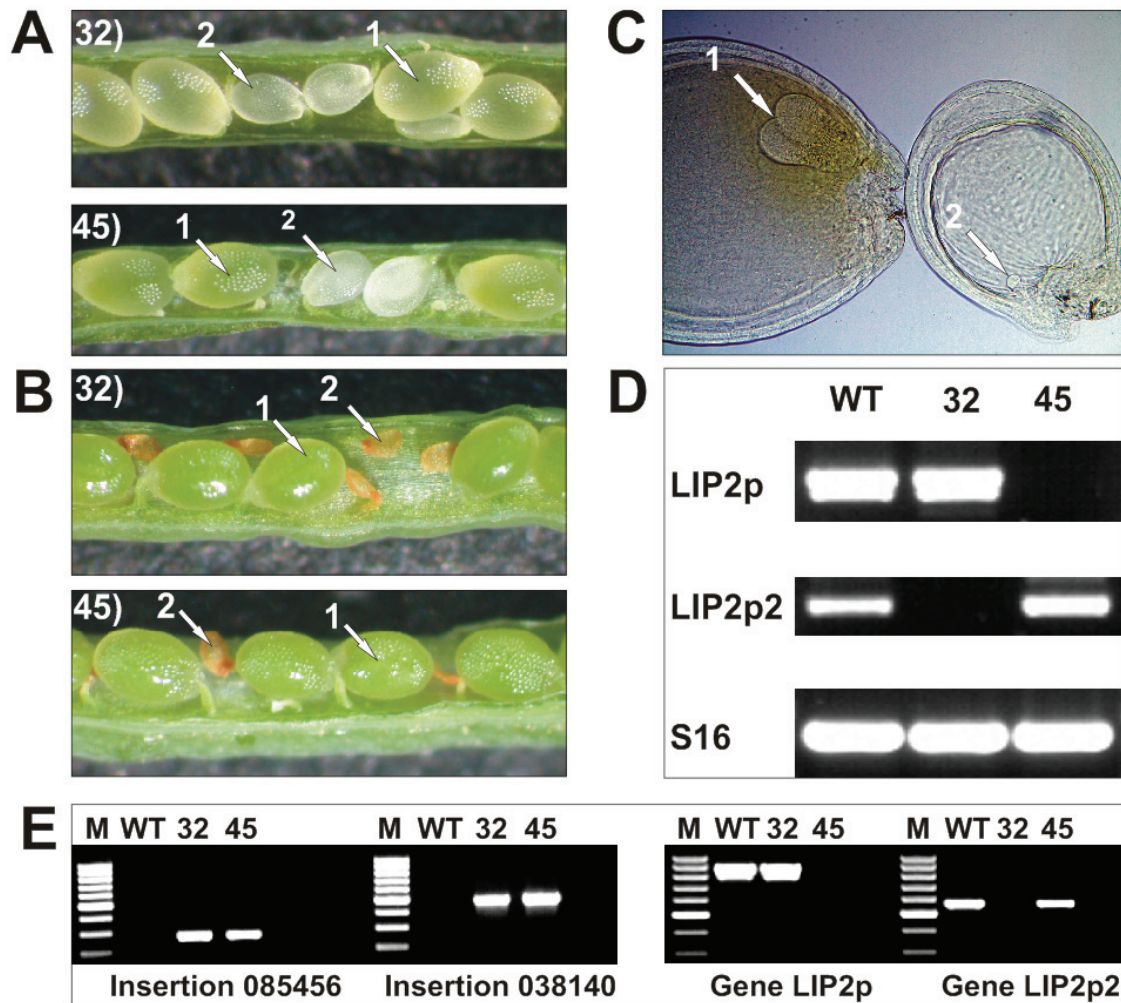


Abbildung 3.49 Der Doppel-Knock-out von LIP2p und LIP2p2 führt zur Embryoletalität

A, B: Mikroskopische Aufnahmen jüngerer und älterer Schoten heterozygot/homozygoter (32) und homozygot/heterozygoter (45) *lip2p-2/lip2p2-1* T-DNA-Insertionsmutanten mit normalen (1) und deformierten (2) Samen.

C: Normale (1) und deformierte (2) mit Hoyerscher Lösung entfärbte Samen jüngerer Schoten. Die Embryonen werden durch die Pfeile markiert.

D: Transkript-Knock-out der LIP2p- bzw. LIP2p2-Transkripte in den Linien 45 und 32. Bei der offensichtlichen Doppelbande (LIP2p) handelt es sich um die erwartete Transkriptbande (obere Bande) sowie um eine mRNA-Spliceform (untere Bande). Ausführlich beschrieben im Anhang (7.2.3)

E links: PCR-Nachweis der T-DNA-Insertion von SALK_085456 (*lip2p-2*) und SALK_038140 (*lip2p2-1*) in den Linien 32 und 45.

E rechts: PCR-Nachweis des endogenen LIP2p- bzw. LIP2p2-Gens in den Linien 32, 45 und im Wildtyp.

4 Diskussion

4.1 mtKAS ist ein wichtiges, jedoch nicht obligatorisch notwendiges Enzym für die mitochondriale Proteinlipoylierung in *Arabidopsis*

Durch die Genkartierung der durch EMS-Behandlung erzeugten Mutation konnte gezeigt werden, dass im mtKAS-Gen von *mtkas-1* (*gld1*) ein Basenaustausch am Ende des 7. Introns vorliegt (Abbildung 1.3). Die vergleichenden Analysen mit T-DNA Insertionsmutanten belegten zweifelsfrei, dass diese detektierte Punktmutation im Gen der mitochondrialen β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] (ACP) Synthase die Ursache für den dramatisch veränderten Phänotyp dieser Mutante darstellt. Die eindeutig als homozygot vorliegenden mtKAS T-DNA-Insertionsmutanten (Abbildung 3.2) weisen den gleichen photorespiratorischen Phänotyp (langsames, chlorotisches Wachstum unter Normal-Luft Bedingungen, jedoch wildtypähnliches Wachstum unter erhöhten CO₂-Bedingungen) auf. Dieses Wachstum sowie weitere Analysen z. B. GDC-Messung, Bestimmung bestimmter Aminosäure-Gehalte usw. (Somerville and Ogren, 1982) war viele Jahre der Grund für die Annahme, dass es sich bei *mtkas-1* um eine Mutante mit einer Mutation in einem der Gene der Glycin-Decarboxylaseproteine handeln müsse. Die mtKAS-Mutanten zeigen ähnliche Veränderungen im Aminosäurespektrum wie beschriebene Mutanten im C₂-Zyklus (Somerville and Ogren, 1981 usw.; Schjoerring et al., 2006; Eisenhut et al., 2008). Der stark erhöhte Anstau von Glycin während der Lichtperiode, gekoppelt mit dem komplementären Anstau von Serin während der Dunkelphase (Abbildung 3.5) ist ein sicheres Merkmal für eine Störung im mitochondrialen Schritt des photorespiratorischen Umsatzes von 2-Phosphoglycolat zu 3-Phosphoglycerat. Dieser dramatische Glycin-Anstau verursacht wiederum einen Rückstau der Metabolite Glyoxylat (Abbildung 3.6) und Glycolat (Eisenhut et al., 2008), den Vorstufen von Glycin im C₂-Zyklus. Dieser Anstau wird hervorgerufen, da die Mitochondrien von mtKAS-Mutanten nicht mehr in der Lage sind Glycin umzusetzen (Abbildung 3.7). Jedoch konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei dem Defekt der GDC nicht um eine Mutation in einem der GDC-Proteine handelt. In *mtkas*-Pflanzen liegt eine indirekte Unterdrückung der enzymatischen Aktivität, hervorgerufen durch das nahezu vollständige Fehlen der wichtigen prosthetischen Gruppe Liponsäure am H-Protein, vor (Abbildung 3.10). Diese prosthetische Gruppe fehlt teilweise auch, jedoch in abgeschwächter Form, an den E2-Einheiten der Enzymkomplexe Pyruvat-Dehydrogenase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, deren Aktivitäten in *mtkas*-Mitochondrien um ca. 60 % bzw. 80 % reduziert sind (Abbildung 3.8). Allerdings führt diese, im Vergleich zum H-Protein abgeschwächte LA-Reduktion, nur unwesentlich zu verringerten Umsatzraten von Substraten des TCA-Zyklus (z. B. Malat Abbildung 3.7).

Der Grund der LA-Reduktion der Proteine in den mtKAS-Mutanten ist begründet durch das fehlende Produktspektrum der mtKAS. Die mtKAS synthetisiert als einzig bekannte mitochondriale FAS verschieden lange Fettsäuren am Acyl-Carrier-Protein. Vorrangig sind dies C₈ und C₁₄-C₁₆ lange Fettsäuren (Gueguen et al., 2000; Yasuno et al., 2004). Dieses bimodale Produktspektrum beruht auf der Tatsache, dass die Acyl-Bindetasche durch die Rotation von Ile154 bzw. Met154 (AtmtKAS bzw. HsmtKAS) erweitert werden kann (Olsen et al., 2004; Christensen et al., 2007). Das gebildete C₈-ACP ist Ausgangsprodukt für die Lipoyl-(Octanoyl-)Transferase, welche die Octanoylgruppe auf die jeweiligen E2-Untereinheiten bzw. das H-Protein überträgt. Dort wird die fertige Liponsäure durch den Einbau von 2 Schwefelatomen durch die Lipoat-Synthase vervollständigt.

Durch den Knock-out in den *mtkas*-Pflanzen wurde somit der bisher einzig bekannte Weg zur *de novo* Synthese von Octanoyl-ACP im Mitochondrium geblockt. Hieraus resultiert eine marginale Restlipoylierung (< 5 %) des H-Proteins der GDC, welche sich in einer schweren Störung des photorespiratorischen Metabolismus äußert.

Die Befunde der Untersuchungen der mtKAS-Mutanten lassen den Schluss zu, dass die mitochondriale Proteinlipoylierung, wenn auch nur in sehr geringem Maße (H-Protein), auch unabhängig von der mtKAS katalysierten Octanoyl-ACP Synthese ablaufen kann.

Der Ausfall der mtKAS führt in *Arabidopsis* jedoch zu vergleichsweise geringen Beeinträchtigungen des pflanzlichen Wachstums. Hefezellen mit Defekten des mtFAS II Stoffwechselweges hingegen, haben kleinere Mitochondrien und einen respirationsdefizienten Phänotyp (Schonauer et al., 2009; Hiltunen et al., 2009). Aufgrund der Möglichkeit des anaeroben Stoffwechsels ist es dennoch möglich diese Hefemutanten zu kultivieren. Der Unterschied zwischen *Arabidopsis*- und Hefemutanten mit Defekten der mitochondrialen Fettsäuresynthese könnte durch die differenzierte Komplexität des Zellaufbaus und somit völlig verschiedenen Bereitstellungen von Fettsäuren aus unterschiedlichen Organellen (z. B. pflanzliche Chloroplasten, Peroxisomen usw.) bedingt sein.

Da bisher keine Hinweise für einen mitochondrialen mtKAS unabhängigen Octanoyl-ACP Syntheseweg bekannt sind, ist es wahrscheinlicher, dass es zu einem Import von Octanoat aus dem Zytosol kommt. Mögliche Quellen könnten z. B. die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren der Peroxisomen (Graham and Eastmond, 2002; Rylott et al., 2006) oder die Versorgung mit Fettsäuren aus dem Chloroplasten sein (Koo et al., 2004; Jouhet et al., 2004). Es ist bekannt, dass in Pflanzen der Chloroplast der Hauptsyntheseort für Acyl-Gruppen, welche in Zellmembranen eingebaut werden, ist (Ohlrogge et al., 1979). Ebenfalls sind Transportmechanismen und beteiligte Proteine des Transfers zwischen dem Chloroplasten und dem Endoplasmatischen Retikulum (Xiao and Chye, 2009; Benning, 2009; Xu et al., 2010) sowie zwischen Chloroplast und Peroxisom (Kunz et al., 2009) bereits

näher untersucht. Es wäre somit absolut denkbar, dass der Transfer von Fettsäuren aus anderen Zellkompartimenten den Ausfall der mtKAS kompensieren kann, auch wenn diese Prozesse bisher weniger gut untersucht sind. Neuere Befunde aus *E. coli* belegen das Vorkommen freier C₈-Fettsäuren in den bakteriellen Zellen, eine bis dato unbekannte Entdeckung (Hermes and Cronan, 2009; Rock, 2009). Woher diese freien Octansäuren stammen und ob solche kurzen freien Fettsäuren eventuell auch in pflanzlichen Mitochondrien existieren, bedarf in Zukunft näherer Untersuchungen. Da die Hauptversorgung des Mitochondriums mit Octanoyl-ACP via mtKAS-Synthese durch den Knock-out in *mtkas*-Linien unterbrochen wurde, schien die Annahme plausibel, dass die gefundene Restlipoylierung von Enzymen, welche freie Fettsäuren für die Octanoylierung nutzen können, bewerkstelligt wird. In Reis konnten Kang et al., 2007 ein Enzym (OsLPLA) mit hoher Sequenzähnlichkeit zur Lipoat-protein Ligase A aus *E. coli*, welche Proteine mit freier Liponsäure/Octansäure lipoyliert (Morris et al., 1994), identifizieren. Die OsLPLA scheint putativ mitochondrial lokalisiert zu sein. In dieser Arbeit konnte eine Sequenz für ein homologes Enzym in *Arabidopsis* identifiziert und näher charakterisiert werden.

4.2 Die Bedeutung der AtLPLA und der LIP2 in der mitochondrialen Proteinlipoylierung

Die Entdeckung einer Lipoat-protein Ligase A in Reis (Kang et al., 2007) bestärkte die Annahme, dass ein homologes Enzym in *Arabidopsis* für das Restlipoylierungsmuster in mtKAS-Mutanten verantwortlich sein könnte. In dieser Arbeit wurde eine AtLPLA identifiziert und erstmalig experimentell gezeigt, dass pflanzliche LPLAs im Mitochondrium lokalisiert sind (Abbildung 3.16). Um die Aufgabe von pflanzlichen LPLAs näher zu untersuchen, sollten Knock-out-Linien selektiert werden. Die Befunde, dass die LPLA aus *Arabidopsis* ein essentielles Enzym für die Samenentwicklung ist, da der Knock-out zu einem embryonalen Phänotyp führt, beweist, dass die Aufgabe des Enzyms in Pflanzen nicht nur in der Rückführung bzw. im Recycling von Liponsäure liegen kann.

E. coli LPLA Knock-out-Mutanten hingegen zeigen keinerlei Wachstumsdefizite, da die Proteinlipoylierung gänzlich von den Enzymen des Lipoat-Syntheseweges übernommen wird (Morris et al., 1995). Die EcLPLA dient dem Bakterium um externe Liponsäure/Octansäure aus der Umgebung nutzbar zu machen. Obwohl *E. coli* Zellen auch freie interne Octansäure beinhalten, liegen die Konzentrationen unterhalb der gemessenen K_m-Werte der *E. coli* LPLA und können somit nicht für die Proteinlipoylierung verwendet werden (Hermes and Cronan, 2009). Durch Wachstumsversuche von *E. coli* Stämmen, denen die Lipoyl-Transferase fehlte, konnten Klone mit mutierten EcLPLA Formen detektiert werden, die verringerte K_m-Werte für Octanoat zeigten. Diesen Klonen war es möglich durch die Nutzung der intrazellularen Octansäure auf Minimalmedium-Platten zu wachsen. Eine der mutierten

EcLPLA-Formen hatte einen 20fach verringerten K_m -Wert aufgrund eines Aminosäureaustausches in Position 19 von V→L (Abbildung 3.12), welcher möglicherweise die Affinität des Proteins für Octansäure durch die Bildung einer hydrophoberen Umgebung erhöht (Hermes and Cronan, 2009). Die Autoren merkten jedoch an, dass die K_m -Wert-reduzierenden Mutationen in den LPLA-Proteinen anderer Organismen nicht konserviert sind. Jedoch wurden bei den vergleichenden Untersuchungen keine pflanzlichen LPLA Sequenzen einbezogen. In pflanzlichen LPLAs (OsLPLA, AtLPLA und weitere putative LPLAs), welche hier für ein Aminosäure-Alignment verwendet wurden, scheint das Leucin an genau der beschriebenen Position hoch konserviert zu sein (Abbildung 3.12, Pfeil). Trotz bisher fehlender Beweise ist es vorstellbar, dass freie Octansäure auch im Mitochondrium existiert und es scheint zudem nachvollziehbarer, dass in pflanzlichen Mitochondrien Octanoat (bzw. die aktivierte Form) und nicht freie LA das Substrat für die LPLAs darstellt.

Bisher konnten jedoch nur geringe Enzymaktivitäten der AtLPLA in Komplementationsstudien (Abbildung 3.17; Abbildung 3.18) bzw. in *in vitro* Assays (Abbildung 3.20) ermittelt werden, was dieser Theorie widerspräche. Es existieren jedoch analoge Daten von Komplementationsanalysen der LPLA aus *Thermoplasma acidophilum*, einer LPLA, welche eine vergleichbare Länge wie die AtLPLA hat, und von der gezeigt wurde, dass diese kürzere LPLA ein sogenanntes „Helfer-Enzym“ (LPLB) benötigt. Dieses Enzym ist notwendig, um zusammen mit der TaLPLA, Liponsäure unter Verwendung von ATP zu Lipoyl-AMP zu aktivieren, welches dann von der TaLPLA verwendet werden kann um Apoproteine zu lipoylieren (Christensen and Cronan, 2009; Posner et al., 2009). Bei LPLAs der längeren Form, z. B. der EcLPLA, ist die CTD (*C-terminal domain*) essentiell für die Aktivierung von LA. Die Autoren gehen davon aus, dass der Lipoyl-Ligase-Komplex in Archaea (LPLA und LPLB als separate Proteine) ein evolutionäres Relikt sein könnte und die *accessory domain* im Lauf der Evolution an die Ligasesequenz angefügt wurde (Christensen and Cronan, 2009).

Die Versuche in dieser Arbeit, die *in vitro* Aktivität der AtLPLA bzw. der OsLPLA durch die Fusion mit der CTD der EcLPLA zu steigern, schlugen fehl. Der Grund hierfür ist eventuell die abweichenden Proteinsequenzen zwischen pflanzlichen und bakteriellen LPLAs. Auch die separate Zugabe der CTD als eigenständiges nicht fusioniertes Protein, resultierte nicht in einer messbaren Proteinocanoylierung.

Die einzig gemessene *in vitro* Aktivität der AtLPLA wurde verzeichnet, als TM137 Lysat als Apoprotein im Enzymassay eingesetzt wurde (Abbildung 3.20). Die Signalstärke der radioaktiven Markierung der TM137 Apoproteine nahm jedoch bei erhöhter Gabe von AtLPLA nicht zu, sondern eher ab. Da die AtLPLA in BL21 Zellen exprimiert wurde, wären Verunreinigungen mit EcLPLA und die hieraus resultierenden leichten Aktivitäten durchaus denkbar. Diese Tatsache kann jedoch aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden:

Erstens müsste die gefundene Aktivität bei erhöhtem Volumen von AtLPLA Säuleneluat ebenfalls ansteigen, wenn es sich um co-aufgereinigte EcLPLA Aktivität handeln würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Zweitens müsste diese geringe EcLPLA Aktivität bei allen Apoprotein-Ansätzen und nicht nur bei TM137 Extrakt zu verzeichnen sein, da eindeutig gezeigt wurde, dass die EcLPLA auch alle anderen Apoproteine (AtGLDH1 oder *mtkas-2* Mitochondrien) octanoylieren kann. Das TM137 Lysat, welches für den Ansatz in Abbildung 3.20 A verwendet wurde, wurde relativ frisch aus TM137 Zellen extrahiert, d. h. einen Tag vorher hergestellt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Dasselbe Lysat wurde ca. zwei Wochen später für den Ansatz B in Abbildung 3.20 genutzt. Eine Erklärung für diese Befunde könnte ein zusätzliches Enzym im TM137 Lysat (in *E. coli*) sein, welches freie, extern gereichte, radioaktiv markierte Octansäure aktivieren kann. Dieses Enzym würde bei längerer Lagerung bei -20 °C an Aktivität verlieren, weshalb auch bei erhöhten Zugaben von AtLPLA keine Steigerung, sondern eher eine Abnahme der Signalstärken detektiert wurde. Dies würde auch erklären, warum nur bei Verwendung von TM137 Lysat als Apoproteinzusatz und auch nur kurz nach Aufbereitung von TM137 Lysat, AtLPLA Aktivität erkennbar war. Diese Erkenntnisse stimmen mit Befunden von, mit *Thermoplasma* LPLA komplementierten, TM131 Zellen (*lipA/lplA*) überein, welche ebenfalls geringe KGDH und PDH Aktivitäten zeigten. In *in vitro* Tests mit gereinigter *Thermoplasma* LPLA konnte hingegen nie Aktivität mit freier Liponsäure/Octansäure gemessen werden (McManus et al., 2006; Christensen and Cronan, 2009). Die Autoren schlussfolgerten, dass die LPLA entweder in sehr geringem Maße ohne LPLB Liponsäure aktivieren kann oder dass ein LA aktivierendes, bisher unbekanntes Enzym in *E. coli* vorhanden sein müsse.

All diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass in pflanzlichen Mitochondrien ein bzw. mehrere Enzyme existieren, welche notwendig sind um Octansäure für die Nutzung durch die pflanzlichen LPLAs zu aktivieren. BLAST *search* Analysen, bei denen bakterielle LPLB bzw. CTD Aminosäuresequenzen verwendet wurden um ähnliche Peptide im *Arabidopsis* Genom zu identifizieren, erbrachten keine aufschlussreichen Erkenntnisse. Jedoch gibt es in den bekannten LPLB/CTD Sequenzen nur wenige hoch konservierte Aminosäuren und zudem sind diese Sequenzen relativ kurz (ca. 80-100 AS). Daher ist es unwahrscheinlich durch Sequenzvergleiche Kandidatenproteine in *Arabidopsis* zu identifizieren.

In tierischen Organismen benötigt die Lipoyl-Transferase ein sogenanntes *lipoate-activating enzyme* (LAE) zur Aktivierung von Liponsäure/Octansäure. Säugetier-Lipoyl-Transferasen fehlt die Fähigkeit selbständig Lipoyl-AMP zu synthetisieren (Fujiwara et al., 1997; Fujiwara et al., 2001; Fujiwara et al., 2007). LAE ist ein ca. 580 AS langes Protein, welches bevorzugt GTP anstelle von ATP für die Aktivierung von LA nutzt. Sequenzvergleiche von LAE mit dem *Arabidopsis* Genom (BLASTP) ergaben, dass LAE die höchsten Ähnlichkeiten zu einer großen Superfamilie von sogenannten *acyl-activating enzymes* (AAE) besitzt. Diese Gruppe

von Enzymen wird als Enzymgruppe, die verschiedene Carbonsäure als Substrat verwenden und durch die Pyrophosphorylyse von ATP enzymgebundene Acyl-AMP Intermediate formen, definiert (Shockey et al., 2003). Zu dieser Gruppe gehören *acyl:coenzymeA synthases* (ACS), wie z. B. *4CL-like ACS (4-coumarate:CoA ligase)* oder *long-chain acyl-CoA synthetases* (LACS) (Shockey et al., 2003; Souza et al., 2008). Die AAEs sind in verschiedene Stoffwechselwege involviert. Diese wären z. B. die Phylloquinone Synthese (Kim et al., 2008b), die Biosynthese von Jasmonat (Koo et al., 2006) oder die Beteiligung in der Aktivierung und Elongation von exogenen Fettsäuren durch plastidäre Acyl-Acyl Carrier Protein Synthasen (Koo et al., 2005). Bisher konnten nur AAEs in Peroxisomen (z. B. Souza et al., 2008) oder in den Plastiden (z. B. Kim et al., 2008b) lokalisiert werden. Von einer großen Anzahl AAEs ist die Funktion sowie die Lokalisation noch nicht nachgewiesen und es wäre somit denkbar, dass es mitochondriale AAEs gibt, die an der Aktivierung von Octanoat zu Octanoyl-AMP als Substrat für die Lipoat-protein Ligase A beteiligt sind. In zukünftigen Arbeiten wird es notwendig sein zu untersuchen, ob eine gesteigerte Aktivität der LPLA bei Gabe von Octanoyl-AMP zu verzeichnen ist. Hierbei könnte die Nutzung des tierischen LAE als Enzym für die Bereitstellung von aktivierter Octansäure/Liponsäure hilfreich sein. Bei erfolgreichen Proteinlipoylierungen/-octanoylierungen und somit der Bestätigung der Theorie, dass die AtLPLA durch ATP bzw. GTP aktivierte C₈-Fettsäuren als Substrat verwendet, müsste im nächsten Schritt das verantwortliche analoge LAE Enzym in *Arabidopsis* identifiziert werden.

Ein interessanter Befund der AtLPLA Komplementationsstudien in TM137 war die Substratpräferenz der AtLPLA zur E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (Abbildung 3.17). Nach 12 Stunden konnten in der *E. coli* Mutante TM137 nur lipoylierte PDH E2-Untereinheit, jedoch keine lipoylierten KGDH E2-Untereinheit detektiert werden. Erst nach 24 Stunden wurde im Western Blot gebundene Liponsäure an der E2-Untereinheit der KGDH nachgewiesen. Generell kann angenommen werden, dass die Ursache für die langsame bzw. geringe Komplementation das Fehlen der LA aktivierenden Domäne der AtLPLA ist. Somit war, die in TM137 Zellen exprimierte, AtLPLA auf die Versorgung mit Lipoyl-AMP durch ein bisher unbekanntes, anscheinend wenig aktives Enzym in den *E. coli* Zellen angewiesen. Auch Lipoat-protein Ligasen aus anderen Organismen scheinen spezifische Apoprotein-Substratspezifitäten zu haben. *Plasmodium falciparum* besitzt zwei Lipoat-protein Ligasen PfLIPLA1 und PfLIPL2 (Günther et al., 2007; Allary et al., 2007; Günther et al., 2009). In analogen Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, dass diese beiden Ligasen, bei der Expression in der *E. coli* Mutante TM136, verschiedene Apoproteine in unterschiedlich starkem Maße lipoylieren. Während PfLIPL1 eine anscheinend höhere Affinität zu KGDH besitzt, konnten bei PfLIPL2 ebenfalls nur lipoylierte PDH E2-Untereinheit im Western Blot detektiert werden (Allary et al., 2007). Aktivitätsmessungen der PDH und

KGDH von komplementierten TM131-Zellen ergaben, dass auch die LPLA aus *Thermoplasma acidophilum*, wie PfLIPL1, E2-Untereinheiten der KGDH schneller lipoyliert. Dadurch wurden höhere Aktivitäten der KGDH im Vergleich zur PDH Aktivität gemessen (Christensen and Cronan, 2009). Ein phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit der Internetplattform Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr/), zeigt die höhere Ähnlichkeit der PfLIPL1 zu bakteriellen LPLAs. PfLIPL2 hingegen besitzt eine höhere Ähnlichkeit zu pflanzlichen LPLAs. Diese Sequenzähnlichkeiten stehen in Übereinstimmung mit den vergleichbaren Substratpräferenzen der LPLAs zu unterschiedlichen Apoproteinen.

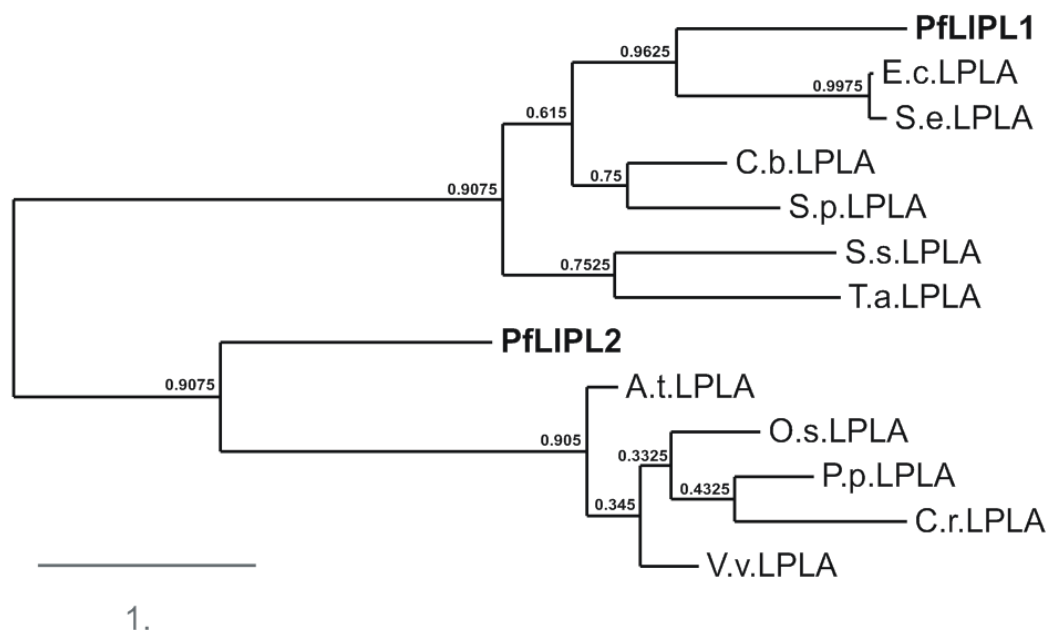


Abbildung 4.1 Phylogenetische Analysen von Lipoat-protein Ligasen.

Die Analysen wurden mit der Internetplattform Phylogeny.fr erstellt. Verwendete Sequenzen sowie *accession numbers* wie in Abbildung 3.12. Die Lipoat-protein Ligasen PfLIPL1 (DQ400341) und PfLIPL2 (CAD52290) aus *Plasmodium falciparum* wurden hervorgehoben.

Durch die Herstellung und Untersuchungen der AtLPLA-RNAi-Linien konnten wichtige Erkenntnisse über die Funktion der AtLPLA im pflanzlichen Stoffwechsel gewonnen werden. Pflanzen, bei denen die AtLPLA auf ein Minimum des normalen Gehaltes reduziert worden war, zeigten ein gestesstes Erscheinungsbild. Sie wiesen ein verkürztes Wurzelwachstum auf, die Rosettenblätter verfärbten sich stark violett und die äußeren Rosettenblätter fingen nach ca. 6-8 Wochen an abzusterben (3.2.5, Linie 1). Durch die Untersuchungen des Lipoylierungslevels konnte der ausgeprägte Phänotyp der Linie 1 erklärt werden. Die Reduktion der AtLPLA führte zu stark vermindert lipoylierten mitochondrialen PDH und KGDH E2-Untereinheiten, essentiellen Enzymen des mitochondrialen TCA-Zyklus. Hierbei

konnten, wie schon in den *mtkas* Pflanzen, Unterschiede zwischen dem Blatt- und Wurzellipoylierungsmuster detektiert werden. In Blättern führte die Reduktion der AtLPLA vorrangig zu einer Verminderung gebundener Liponsäure an den Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase. Hingegen zeigten die Wurzelproteine der AtLPLA-RNAi-Pflanzen eine ähnlich starke LA-Reduktion aller Apoproteine (Abbildung 3.27). Durch das Lipoylierungsmuster der AtLPLA-RNAi-Linie 21, welche ebenfalls eine starke Reduktion der AtLPLA aufwies, konnte eine weitere wichtige Entdeckung getätigt werden. Die Linie 21 zeigte ähnlich starke Transkript- und Proteinreduktionen der AtLPLA wie die Linie 1, jedoch wurden keine signifikanten Veränderungen des Wachstums der Rosetten festgestellt, was für eine leicht abgeschwächte Reduktion verglichen mit Linie 1 spricht. Aus dem Lipoylierungsmuster der Linie 21 wurde ersichtlich, dass die Reduktion der AtLPLA präferenziell die Proteinlipoylierung in der Wurzel von *Arabidopsis* beeinflusst. Während im Blattlipoylierungsmuster kaum Unterschiede zwischen Linie 21 und WT erkennbar waren, wies die Linie 21 ein stark reduziertes Lipoylierungsmuster der Wurzelproteine auf.

Während der Knock-out der *mtKAS* zu einer dramatischen LA-Reduktion der Blattmitochondrienproteine und keiner nachweislichen Beeinflussung der Wurzelproteine führte, zeigten AtLPLA-RNAi-Linien genau komplementäre Lipoylierungsmuster. Aus dieser Tatsache lässt sich schlussfolgern, dass die mitochondriale Proteinlipoylierung in der Wurzel nahezu vollständig von der AtLPLA bewerkstelligt wird, wobei das über den *mtKAS*-Weg synthetisierte Octanoyl-ACP nicht benötigt wird.

In Mitochondrien dient Octanoyl-ACP, welches von *mtKAS* produziert wird, als Vorstufe für die Synthese von Liponsäure (Wada et al., 1997; Gueguen et al., 2000). Die Octanoyl-[Acyl Carrier Protein]-protein N-octanoyltransferase (kurz Lipoyl-Transferase) nutzt dieses Octanoyl-ACP, bildet ein Acyl-Enzym Intermediat und überträgt die C₈-Fettsäure auf die jeweiligen Apoproteine (Zhao et al., 2005; Kim et al., 2008a). Es wurde ermittelt, dass die Octanoyl-Gruppe erst an die Apoproteine angehängt wird (Gueguen et al., 2000), bevor die Lipoat-Synthase die Insertion zweier Schwefelatome an die C-6 und C-8 Position der Octanoyl-Gruppe, gebunden am H-Protein bzw. den E2-Untereinheiten, katalysiert (Zhao et al., 2003). *E. coli* Zellen können bei Gabe externer Liponsäure/Octansäure wachsen, auch wenn ein Knock-out der Lipoyl-Transferase (LIPB) und somit des Syntheseweges vorliegt (Morris et al., 1995). In diesem Fall werden die Apoproteine von der EcLPLA mit Hilfe freier Liponsäure/Octansäure lipoyliert bzw. octanoyliert. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Lipoyl-Transferase aus *E. coli* keine messbare Aktivität mit freier Liponsäure/Octansäure und ATP besitzt (Jordan and Cronan, Jr., 2003). In pflanzlichen Blattmitochondrien läuft der Großteil der Proteinlipoylierung via *mtKAS* und Liponsäure-Biosyntheseweg ab. Ein Ausfall der *mtKAS* führt zu einer dramatischen Reduktion lipoylierter Mitochondrienproteine. Die Befunde der Co-Regulation von LIP2 (mitochondrialer Lipoat-Biosyntheseweg) mit

photorespiratorischen Enzymen, deuten auf eine Spezialisierung des LA-Metabolismus in Pflanzen hin. Die Photorespiration ist ein Stoffwechselweg mit hohen Stoffflussraten in C_3 -Pflanzen und Defekte in der Glycin-Decarboxylase oder der Serin-Hydroxymethyltransferase führen zu fatalen Auswirkungen auf die pflanzliche Entwicklung (Voll et al., 2006; Ewald et al., 2007; Engel et al., 2007). Deswegen ist es für Pflanzen notwendig die Funktionalität und die Bereitstellung der beteiligten Enzyme zu gewährleisten. Es konnten korrelierende Transkriptionsraten von LIP2 und den photorespiratorisch regulierten H-Proteinen (AtGLDH1 und AtGLDH3) in verschiedenen Geweben sowie Entwicklungsstadien von *Arabidopsis* ermittelt werden (Abbildung 3.29). Zudem konnte erstmalig durch Western Blot Studien mit einem Antikörper gegen LIP2 zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die LIP2, im Gegensatz zur AtLPLA, hauptsächlich im Blatt exprimiert wird (Abbildung 3.30). Neben den Befunden der marginalen H-Protein Restlipoylierung in *mtkas* Pflanzen (Abbildung 3.10) konnten weitere Hinweise für die vorrangige Lipoylierung der H-Proteine in *Arabidopsis*blättern erbracht werden. Untersuchungen des Lipoylierungsstatus von mitochondrialen Blattproteinen ergaben, dass nur das H-Protein in *Arabidopsis* Blattmitochondrien vollständig lipoyliert vorliegt (Abbildung 3.31). Zudem wurden überexprimierte *Flaveria* H-Proteine in *Arabidopsis* ebenfalls lipoyliert, was sogar mit einer Verringerung der Lipoylierung der PDH und KGDH E2-Untereinheiten einherging.

Es wurde bewiesen, dass auch der Knock-out von LIP2 in einem embryoletalen Phänotyp (Abbildung 3.34) resultiert. Dies wiederum war überraschend, da *mtKAS* Knock-out-Pflanzen lebensfähig sind. Beruhend auf der Annahme, dass die Lipoyl-Transferase aus *Arabidopsis* genauso wie die Lipoyl-Transferase aus *E. coli* (Jordan and Cronan, Jr., 2003) keine freie Liponsäure/Octansäure als Substrat verwenden kann, kann davon ausgegangen werden, dass es noch weitere Wege als den *mtKAS*-Weg für Bereitstellung von Octanoyl-ACP im Mitochondrium geben muss. In Pflanzen existieren mehrere Isoformen von Acyl-Carrier Proteinen (Guerra et al., 1986; Bonaventure and Ohlrogge, 2002), wovon drei Isoformen mitochondrial lokalisiert sind (Meyer et al., 2007). Die mitochondrialen ACPs (*mtACP*) liegen vorrangig als lösliche Matrixproteine vor. Es wurde spekuliert, dass *mtACP2* hauptsächlich am Fettsäuremetabolismus und/oder in der Liponsäure-Biosynthese beteiligt ist. Hingegen wurde angenommen, dass *mtACP1* eine Rolle in der Myristylierung von Untereinheiten membranständiger respiratorischer Komplexe haben könnte. Die Funktion des schwach exprimierten *mtACP3* ist bisher noch nicht geklärt (Meyer et al., 2007). Derzeit kann nur über das Vorkommen mitochondrialer Enzyme, z. B. ACP-Synthasen, spekuliert werden, welche in der Lage sind, mit transportierten Fettsäuren, Octanoyl-ACP zu bilden.

Ebenfalls unerwartet war die Entdeckung, dass in AtLIP2-RNAi-Pflanzen (Linie 6) mit einer über 85%igen Reduktion nicht das H-Protein geringer lipoyliert, sondern die PDH E2-Untereinheiten eine deutliche Verringerung gebundener Liponsäure aufwiesen.

Anhaltspunkte für eine Erklärung dieser Befunde liefern neuere Erkenntnisse der Lipoylierungsmechanismen aus Hefe und *Bacillus subtilis*.

Die Untersuchungen der Liponsäure-Synthese und der Anheftung von LA in Hefe Mitochondrien legt nahe, dass der Liponsäure-Metabolismus in Hefe differenzierter und komplexer als in *E. coli* Zellen vonstatten geht. Für die Proteinlipoylierung in Hefe sind mehrerer Enzyme essentiell. So wiesen Mutanten mit Defekten in homologen Genen zu bekannten Lipoat-Synthasen und Lipoyl-Transferasen keinerlei Restlipoylierung auf. In der Mutante lip3 Δ , mit einem Knock-out in einem homologen LPLA Enzym lag nur das H-Protein lipoyliert vor. Erstaunlicherweise resultierte auch der Knock-out bzw. eine Mutation im H-Protein in einem Fehlen der Proteinlipoylierung der PDH und KGDH. Deshalb spekulierten die Autoren, dass mehrere Enzyme in Hefe (LIP2, LIP3, LIP5, GcV3 und eventuell Lpd1) in der mitochondrialen Proteinlipoylierung als Komplex zusammenwirken (Schonauer et al., 2009). Ähnliche Erkenntnisse lieferten auch die Untersuchungen der Proteinlipoylierung in *Bacillus subtilis* (Christensen and Cronan, 2010; Christensen et al., 2011; Martin et al., 2011). In diesem Gram-positiven Bakterium sind mehrere Enzyme an der Lipoylierung der Apoproteine beteiligt. LIPM, ein Enzym, welches zu einer neuen Gruppe von Lipoyl-Transferasen gehört, ist essentiell für die Proteinlipoylierung aller Apoproteine. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Bacillus subtilis* eine Lipoate-protein Ligase, LPLJ, besitzt, deren Einzel-Knock-out jedoch zu keiner Veränderung im Lipoylierungsmuster führte. Eine faszinierende Neuerung im Verständnis der Proteinlipoylierung stellte die Entdeckung einer, bis dato völlig unbekannten, Amidotransferase (LIPL) dar. Dieses Enzym überträgt H-Protein gebundene Liponsäure auf E2-Untereinheiten. Das H-Protein dient somit als Carrier für Liponsäure. Die Einzel-Knock-out LIPL-Mutante zeigte keine Verringerung der H-Proteinlipoylierung. Jedoch wies sie Beeinträchtigungen der PDH und der BCDH auf, was aus der Notwendigkeit der Gabe von Acetat und einem Mix aus drei *short-branched-chain carboxylic acids* (Umgehung der PDH- und BCDH-Aktivität) für ein adäquates Wachstum ersichtlich wurde. Bei einem Doppel-Knock-out von LIPL und LPLJ wies die putative KGDH E2-Bande im Vergleich zu den Einzelmutanten ebenfalls keine Proteinlipoylierung mehr auf. Diese Befunde zeigen die Komplexität der Proteinlipoylierung in *Bacillus subtilis* auf und sprechen für distinkte Rollen von LIPM und LIPL/LPLJ in der Proteinlipoylierung (Martin et al., 2011).

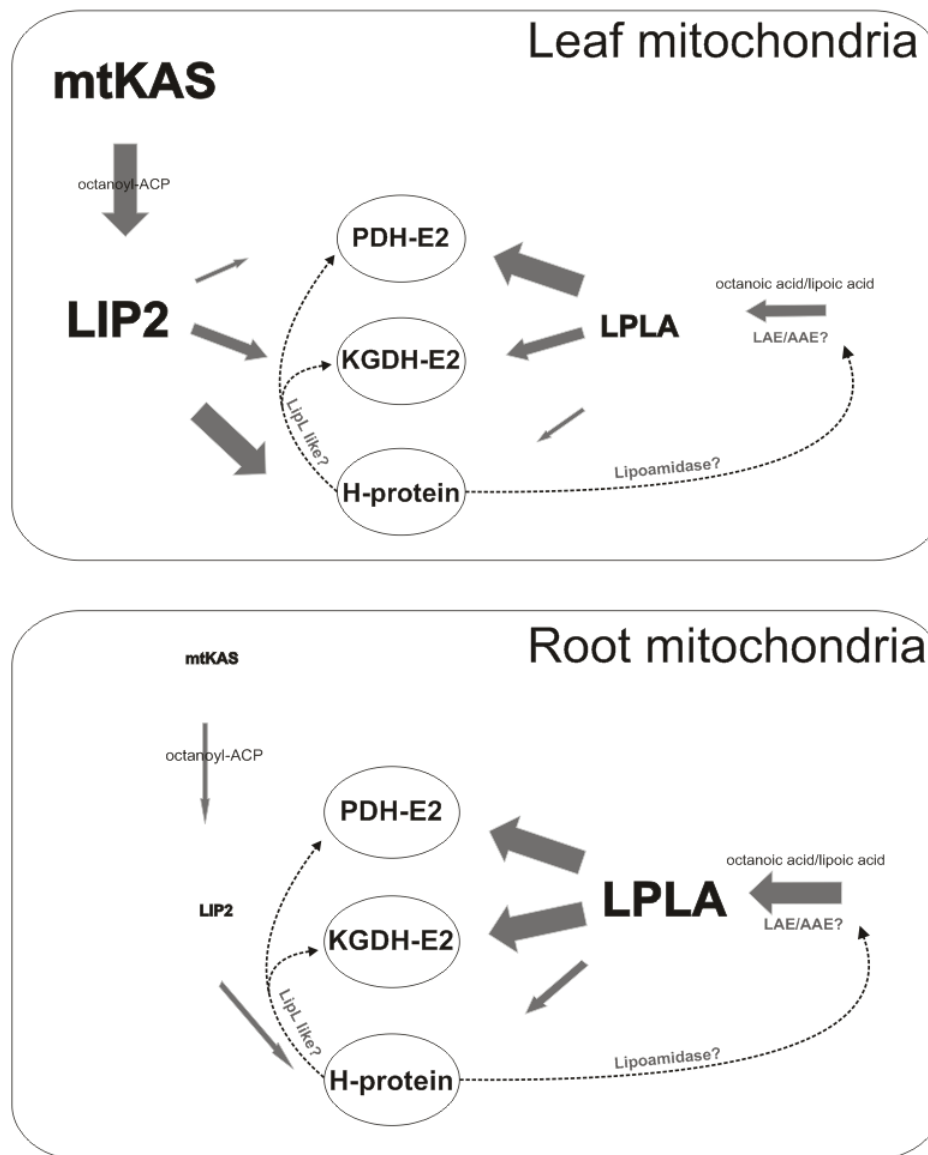


Abbildung 4.2 Model der mitochondrialen Proteinlipoylierung in *Arabidopsis*

In Blattmitochondrien ist die Proteinlipoylierung vorrangig von der Bereitstellung der Liponsäure aus dem Liponsäure-Biosyntheseweg abhängig (mtKAS und LIP2; LIP1 nicht ins Model integriert). Über den LA-Biosyntheseweg wird das H-Protein präferentiell lipoyliert. Die LPLA nimmt in Blattmitochondrien eine wichtige Rolle bei der Lipoylierung der E2-Untereinheiten (speziell PDH-E2) ein. Ein gewisser Teil der Octan-/Liponsäure für die Grundversorgung der E2-Untereinheiten stammt aus einem, bisher unbekannten, mtKAS-unabhängigen Syntheseweg. Erst nach vollständiger Lipoylierung des H-Proteins werden, über den LA-Biosyntheseweg produzierte, Octan-/Liponsäure an die E2-Untereinheiten transferiert/ligiert. Die Existenz von Enzymen mit Lipoamidase- (LPLA) bzw. Enzymen mit Amidotransferase-Funktion (LIPL) ist bisher unbekannt. In Wurzelmitochondrien hingegen werden die E2-Untereinheiten von der LPLA mit mtKAS-unabhängiger synthetisierter Octansäure/Liponsäure lipoyliert. Hier nehmen die mtKAS und LIP2 eine untergeordnete Rolle ein, denn die Vermutung liegt nahe, dass heterotrophe Gewebe mit Liponsäure bzw. LA-Vorstufen (kurzkettige Fettsäuren) versorgt werden.

Die Untersuchungsobjekte Hefe und *Bacillus subtilis* haben den Vorteil der Möglichkeit einer Anzucht unter anaeroben Bedingungen, wodurch essentielle Enzyme der Atmung direkt bzw. indirekt ausgeschaltet werden können. Das Lipoylierungssystem in pflanzlichen Mitochondrien scheint ähnlich komplex zusammenzuwirken, kann jedoch aufgrund der Letalität dieser Mutanten nicht mit Hilfe von Knock-out-Studien untersucht werden. Die Befunde der Embryoletalität von LIP2 und AtLPLA, die Lipoylierungsmuster der RNAi-Linien, das Lipoylierungsmuster von *mtkas* Pflanzen und die gefundene präferenzielle H-Proteinlipoylierung im Blatt zeigen, dass auch in Pflanzen ein komplexes Lipoylierungssystem besteht. Weiterhin lieferten die Ergebnisse dieser Arbeit Aufschluss darüber, dass in Pflanzen zusätzliche Spezialisierungen der mitochondrialen Proteinlipoylierung für unterschiedliche Gewebe vorkommen (Abbildung 4.2).

4.3 Die chloroplastidäre Proteinlipoylierung ist autonom und beinhaltet zwei Lipoyl-Transferasen

In Pflanzen und anderen Eukaryoten sind die meisten Enzyme, die Liponsäure als prosthetische Gruppe benötigen, im Mitochondrium lokalisiert. Die plastidäre Pyruvat-Dehydrogenase mit ihrer Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase-Untereinheit (E2), an die Lipoat gebunden wird, stellt eine Ausnahme dar. Sie ist in Chloroplasten unabdingbar für die Versorgung der Fettsäure-Biosynthese mit Acetyl-CoA (Lernmark and Gardestrom, 1994; Ke et al., 2000; Lin et al., 2003; Tovar-Mendez et al., 2003). Die Chloroplasten sind in Pflanzen die größte, jedoch nicht die einzige Quelle für synthetisierte Fettsäuren (Ohlrogge et al., 1979; Wada et al., 1997; Gueguen et al., 2000).

Die Chloroplasten in *Arabidopsis* enthalten wenigstens zwei Enzyme, die für eine autonome Proteinlipoylierung notwendig sind (Wada et al., 2001b; Yasuno and Wada, 2002). Das erste Enzym, LIP2p, transferiert Octanoyl-Gruppen vom Octanoyl-ACP an Apoproteine. Das zweite Enzym, LIP1p, vervollständigt die Synthese von Liponsäure zu lipoylierten PDH E2-Untereinheiten durch den Einbau von zwei Schwefelatomen unter Verwendung von S-Adenosylmethionin. Bisher war jedoch unbekannt, ob dieser Weg essentiell für die Proteinlipoylierung in Chloroplasten ist oder ob es Redundanzen gibt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die Tatsache genutzt, dass Pflanzen ohne die plastidäre PDH E2-Untereinheit nicht lebensfähig sind (Lin et al., 2003). Deshalb würden Defekte der Enzyme des plastidären Lipoat-Syntheseweges ebenfalls zu letalen Effekten führen, wenn keine redundanten Wege existierten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knock-out von LIP1p (At5g08415) tödliche Folgen für die Samenentwicklung hat (Abbildung 3.37). In Übereinstimmung mit Analysen von *Arabidopsis* Datenbanken, in denen keine zweite plastidäre Lipoat-Synthase entdeckt werden konnte, zeigt dieses Ergebnis die

Einzigartigkeit von LIP1p und belegt, dass die Funktion von LIP1p in *Arabidopsis* nicht durch alternative Wege umgangen werden kann. Das bisher einzig bekannte Enzym eines alternativen Stoffwechselweges ist die Lipoat-protein Ligase A (LPLA), die freie Liponsäure aktivieren kann bzw. aktivierte LA nutzt um Proteine zu lipoylieren. Jedoch konnte keine plastidäre homologe Sequenz zu der in dieser Arbeit beschriebenen, mitochondrialen LPLA ermittelt werden. Somit scheint die chloroplastidäre Proteinlipoylierung nicht nur vollständig autonom zu sein, sondern auch isoliert von externen Liponsäure-Quellen.

Dem gegenüber standen die Befunde, dass die homozygoten Mutationen von LIP2p zu keinen sichtbaren Effekten in Wachstum und Entwicklung von *Arabidopsis* führten (Abbildung 3.38). Dies ist begründet in der Entdeckung einer weiteren Lipoyl-Transferase (LIP2p2), welche sehr hohe Ähnlichkeit zur bekannten LIP2p aufweist (Abbildung 3.39). Durch Lokalisationsstudien konnte zweifelsfrei belegt werden, dass LIP2p2 im Chloroplasten lokalisiert ist (Abbildung 3.42; Abbildung 3.43). In Komplementationsstudien mit dem *E. coli* Stamm TM137 wurde die Funktionalität von LIP2p2 bewiesen (Abbildung 3.44). Zudem erbrachten die Zugaben von externer LA kein verbessertes Wachstum der LIP2p2 exprimierenden TM137 Zellen, was gegen eine Lipoat-Ligase Aktivität spricht (Abbildung 3.46). LIP2p2 wurde mit Hilfe von Sequenzvergleichen (BLAST Analysen) als Uniprot Aminosäuresequenz P0C7R2 identifiziert. Das vorhergesagte Genmodel für die entsprechende chromosomale Lokalisation ist bisher falsch annotiert und bedarf einer Berichtigung (Abbildung 3.40). Dieses fälschlich annotierte Genmodel könnte auch erklären, warum es Wada et al. (2001b) nicht möglich war LIP2p2-Transkript zu amplifizieren. LIP2p2-Expression konnte in allen untersuchten Organen von *Arabidopsis* nachgewiesen werden, wobei LIP2p2 etwas stärker als LIP2p in den Blüten und Schoten exprimiert wird. LIP2p hingegen scheint dominanter in Wurzeln und Blättern transkribiert zu werden (Abbildung 3.41). Der Knock-out von LIP2p2 führte wie bei LIP2p zu keiner Veränderung im Pflanzenwachstum. Somit kann festgehalten werden, dass der Chloroplast von *Arabidopsis* zwei redundante Lipoyl-Transferasen, welche Octanoyl-Gruppen an die PDH E2-Untereinheit binden, enthält. Im Gegensatz hierzu wird der Einbau von Schwefelatomen zur Synthese des Lipoylarms von nur einem Enzym LIP1p katalysiert.

Liponsäure gilt als einzigartiges Antioxidans aufgrund seiner Löslichkeit sowohl in der Wasser- als auch in der Lipidphase und da es schützende Funktionen in beiden Formen, der reduzierten und oxidierten Form, beibehält. Im Zusammenspiel mit anderen Antioxidantien, wie Ascorbat, Gluthathion und Tocopherol, beugt es Lipidperoxidation und Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies vor (Sgherri et al., 2002; Navari-Izzo et al., 2002). Es konnten signifikante Veränderungen im Redoxstatus dieser Antioxidantien bei Pflanzen, die Stressbehandlungen bzw. veränderten Umweltbedingungen unterzogen wurden, beobachtet werden (Perez-Lopez et al., 2010). Untersuchungen zeigten, dass freie Liponsäure in

Pflanzen, speziell im Stroma der Chloroplasten vorliegt (Sgherri et al., 2002). Hierzu passen die Befunde, dass es in Chloroplasten kein Enzym gibt, welches freie Liponsäure für die Proteinlipoylierung nutzt und somit wieder an Apoproteine bindet. Indess konnten nur Enzyme der Biosynthese von LA detektiert werden. Das Vorkommen freier Liponsäure bzw. Dihydroliponsäure bleibt bislang jedoch unerklärlich, da keine Enzyme in Pflanzen bekannt sind, die spezifisch Liponsäure von Proteinen abtrennen. Es wäre jedoch vorstellbar, dass der Chloroplast über bisher unentdeckte Lipoamidasen ähnlich zur *Enterococcus faecalis* LPA (Jiang and Cronan, 2005; Spalding and Prigge, 2009) verfügt, wodurch die Bereitstellung freier Liponsäure für die Schutzmechanismen der Pflanze gewährleistet wären. *Arabidopsis* verfügt über eine Genfamilie von Amidasen, welche Sequenzähnlichkeiten zur LPA aufweisen. Ob Mitglieder dieser Familie neben den bisher beschriebenen Funktionen (Shrestha et al., 2003 usw.; Pollmann et al., 2006) auch LA-Proteinbindung trennen, werden weitere Untersuchungen klären müssen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte der genetischen Hintergrund der GDC-defizienten *mtkas-1* (*gld1*) Mutante (Somerville and Ogren, 1982) durch vergleichende Analysen mit T-DNA Insertionsmutanten bewiesen werden. Die detektierte Mutation blockt den einzig bekannten Stoffwechselweg der *de novo* Synthese von Octanoyl-ACP in Mitochondrien. Dies wiederum führt zur dramatischen Beeinträchtigungen der Lipoylierung des H-Proteins der Glycin-Decarboxylase in Blättern, wodurch die deutlichen Störungen im photorespiratorischen Stoffwechselweg in dieser Mutante hervorgerufen werden. Jedoch konnten marginale Mengen an lipoylierten H-Protein detektiert werden. Diese Tatsache spricht für einen, von der mtKAS katalysierten Octanoyl-Synthese, unabhängigen Lipoylierungsweg. Die restliche Lipoylierung der PDH und KGDH E2-Untereinheiten war indess, wenn auch ebenfalls stark reduziert, deutlich ausgeprägter als die des H-Proteins. Im Gegensatz zu den limitierenden Effekten im Blatt zeigten Wurzelproteine (E2-Untereinheiten der PDH und KGDH) keine reduzierten Liponsäure-Gehalte.

Durch die Entdeckung einer Lipoat-protein Ligase A (AtLPLA) in *Arabidopsis*, den eindeutigen Nachweis der mitochondrialen Lokalisation und den komplementär reduzierten Lipoylierungsmustern von AtLPLA-RNAi-Pflanzen zu mtKAS-Mutanten wurde ein mtKAS-unabhängiger Lipoylierungsweg aufgezeigt, der das in mtKAS-Mutanten detektierte Restlipoylierungsmuster plausibel erklärt. Die Untersuchung einer T-DNA Insertionsmutante (*lplA-1*) bewies, dass die AtLPLA ein essentielles Enzym für die Entwicklung von *Arabidopsis* darstellt. Der Knock-out der AtLPLA führte zur Embryoletalität. Im Gegensatz zur LPLA in *E. coli* ist die LPLA in Pflanzen nicht nur für das Recycling bzw. die Rückführung von freier Liponsäure/Octansäure verantwortlich. In *Arabidopsis* nimmt sie eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Proteinlipoylierung in Wurzeln und im Blatt ein. Hierbei zeigten die Untersuchungen von AtLPLA-RNAi-Linien, dass die E2-Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase hauptsächlich von der AtLPLA lipoyliert werden. Diese Befunde wurden zudem von AtLPLA-Komplementationsstudien einer Liponsäure-auxotrophen *E. coli* Mutante (TM137) gestützt. In diesen Studien wurde die PDH E2-Untereinheit vorrangig durch die AtLPLA lipoyliert. Die TM137 Zellen (Morris et al., 1995), die mit pBAD-HisA/AtLPLA transformiert wurden, wiesen jedoch nur geringe Komplementationsraten auf. Auch in enzymatischen *in vitro* Assays, mit ^{14}C -Octanoat und ATP als Substrat, konnten nur geringe bzw. meist keine Aktivitäten verzeichnet werden. Die AtLPLA, sowie weitere pflanzliche LPLAs besitzen keine CTD (*C-terminal domain*), von der beschrieben wurde, dass sie eine notwendige Funktion in der Aktivierung von Lipoat/Octanoat und ATP zu Lipoyl-(Octanoyl-)AMP hat. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu den Untersuchungen einer LPLA ohne CTD aus *Thermoplasma acidophilum*.

(Christensen and Cronan, 2009) und lassen vermuten, dass es in pflanzlichen Mitochondrien bisher unentdeckte als LAE (*lipoate activating enzyme*) fungierende „Helfer-Enzyme“ geben muss.

Die Untersuchungen der Bedeutung des mitochondrialen Liponsäure-Biosyntheseweges bei dem die mitochondriale Octanoyl-acyl carrier protein (ACP):protein N-octanoyltransferase (kurz: Lipoyl-Transferase, LIP2) von der mtKAS bereitgestelltes Octanoyl-ACP für die Anheftung an LA-Apoproteine nutzt, ergaben eine präferentielle Lipoylierung des H-Proteins in Blattmitochondrien. LIP2 weist eine enge Co-Regulation auf Expressionsebene zu photorespiratorischen Enzymen (AtGLDH1, AtPGLP1) auf. Die Proteinlipoylierungsmuster von *mtkas*-Blattmitochondrien, der experimentelle Befund, dass nur H-Proteine in Wildtyp-Blattmitochondrien vollständig lipoyliert vorliegen sowie die detektierte vorrangige Lipoylierung des H-Proteins in H-Protein-überexprimierenden Arabidopsispflanzen lassen die Schlussfolgerung einer Spezialisierung des Liponsäure-Biosyntheseweg in Blättern von C₃-Pflanzen zu. Diese Spezialisierung dient der Sicherstellung der Verfügbarkeit prosthetischer Gruppen für Enzyme des C₂-Zyklus (H-Proteine) und gewährleistet somit den hohen photorespiratorischen Stoffwechselfluss. Die detektierte Embryoletalität durch den Knock-out der LIP2 zeigte die unabdingbare Notwendigkeit dieses Enzyms in der Samenentwicklung.

Die verringerten Liponsäure-Gehalte der PDH E2-Untereinheiten in der LIP2-RNAi-Linie 6 deuten auf eine wichtige Rolle der Lipoyl-Transferase für die Bereitstellung von Octanoyl-Gruppen hin.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die chloroplastidäre Proteinlipoylierung der Pyruvat-Dehydrogenase autonom abläuft. Der embryoletale Phänotyp des Knock-out der plastidären Lipoat-Synthase (AtLIP1p) lässt einen Transport mitochondrial synthetisierter Liponsäure in den Chloroplasten unwahrscheinlich erscheinen. Der Knock-out der plastidären Lipoyl-Transferase (LIP2p) hingegen führte zu keiner sichtbaren Wachstumsveränderung der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp aufgrund der Existenz einer zweiten plastidären Lipoyl-Transferase (LIP2p2). Diese Lipoyl-Transferase konnte durch Sequenzvergleiche mit bekannten Lipoyl-Transferasen im Genom von *Arabidopsis* identifiziert werden (P0C7R2 Uniprot). Die 280 AS lange LIP2p2 zeigt hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit zur bekannten LIP2p (Wada et al., 2001b). Mit Hilfe von Komplementationsstudien der *E. coli* Mutante TM137 wurde die Funktionalität von LIP2p2 bewiesen. In diesen Studien resultierte die Expression von LIP2p2 in TM137 Zellen in einem verbesserten Wachstum der Zellen in Minimal-M9-Glukosemedium bzw. in der vollständigen Proteinlipoylierung der PDH und KGDH E2-Untereinheiten von TM137. Weiterhin erbrachten Lokalisationsstudien mit isolierten Chloroplasten und einem LIP2p2-Antikörper sowie Untersuchungen mit dem Reportergen *GFP* den eindeutigen Beleg, dass LIP2p2 in Arabidopsiszellen chloroplastidär lokalisiert ist. Das Genmodel (At1g47580) von LIP2p2 ist

bisher jedoch in den meisten *Arabidopsis*-Datenbanken falsch annotiert und bedarf einer Berichtigung, was durch Analyse der LIP2p2 mRNA bestätigt wurde. LIP2p2 wird, wie LIP2p, in allen Organen von *Arabidopsis*, wenn auch in leicht variierenden Stärken, exprimiert. Der unveränderte Phänotyp von LIP2p und LIP2p2 Einzel-Knock-out-Mutanten und der embryonale Phänotyp von LIP2p/LIP2p2 Doppel-Knock-out-Mutanten bewies die Redundanz der beiden Enzyme in der chloroplastidären Proteinlipoylierung.

6 Literaturverzeichnis

- Allary M, Lu JZ, Zhu L, Prigge ST (2007) Scavenging of the cofactor lipoate is essential for the survival of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **63**: 1331-1344
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ et al., (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Artus NN, Naito S, Somerville CR (1994) A mutant of *Arabidopsis thaliana* that defines a new locus for glycine decarboxylation. *Plant and Cell Physiology* **35**: 879-885
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K et al., (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**: 298-305
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**: 330-336
- Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-144
- Benning C (2009) Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**: 71-91
- Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology* **29**: 315-331
- Birnboim HC, Doly J (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523
- Bonaventure G, Ohlrogge JB (2002) Differential regulation of mRNA levels of acyl carrier protein isoforms in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**: 223-235
- Booker SJ (2004) Unraveling the pathway of lipoic acid biosynthesis. *Chem Biol* **11**: 10-12
- Bourguignon J, Neuburger M, Douce R (1988) Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria - properties of the forward reaction catalyzed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *Biochemical Journal* **255**: 169-178
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brautigam A, Gagneul D, Weber APM (2007) High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract. *Analytical Biochemistry* **362**: 151-153
- Chen S, Hofius D, Sonnewald U, Börnke F (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant J* **36**: 731-740
- Christensen CE, Kragelund BB, von Wettstein-Knowles P, Henriksen A (2007) Structure of the human beta-ketoacyl [ACP] synthase from the mitochondrial type II fatty acid synthase. *Protein Science* **16**: 261-272
- Christensen QH, Cronan JE (2009) The *Thermoplasma acidophilum* LplA-LplB complex defines a new class of bipartite lipoate-protein ligases. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21317-21326
- Christensen QH, Cronan JE (2010) Lipoic acid synthesis: A new family of octanoyltransferases generally annotated as lipoate protein ligases. *Biochemistry* **49**: 10024-10036
- Christensen QH, Martin N, Mansilla MC, de Mendoza D et al., (2011) A novel amidotransferase required for lipoic acid cofactor assembly in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **80**: 350-363
- Chuman L, Brody S (1989) Acyl carrier protein is present in the mitochondria of plants and eukaryotic microorganisms. *European Journal of Biochemistry* **184**: 643-649
- Cicchillo RM, Booker SJ (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc* **127**: 2860-2861
- Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM et al., (2004) Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry* **43**: 6378-6386
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743
- Crawford MJ, Thomsen-Zieger N, Ray M, Schachtner J et al., (2006) *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *Embo Journal* **25**: 3214-3222

- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S et al.**, (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465-W469
- Eisenhut M, Bauwe H, Hagemann M** (2007) Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis sp* strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. *Fems Microbiology Letters* **277**: 232-237
- Eisenhut M, Huege J, Schwarz D, Bauwe H et al.**, (2008) Metabolome phenotyping of inorganic carbon limitation in cells of the wild type and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis sp* strain PCC 6803. *Plant Physiology* **148**: 2109-2120
- Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R et al.**, (2006) The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Plant Physiol* **142**: 333-342
- Emanuelsson O, Nielsen H, Von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**: 978-984
- Engel N** (2010) Funktionelle Charakterisierung der mitochondrialen GDC- und SHM-Genfamilien in *Arabidopsis thaliana* durch Komplementation mit heterologen Genen. Dissertation. Universität Rostock Abteilung Pflanzenphysiologie
- Engel N, Eisenhut M, Qu N, Bauwe H** (2008) *Arabidopsis* mutants with strongly reduced levels of the T-protein subunit of glycine decarboxylase. In *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Allen, JF, Gantt, E, Golbeck, JH, Osmond, B (Eds) Springer, 819-822
- Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K et al.**, (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiology* **144**: 1328-1335
- Ewald R** (2005) Charakterisierung transgener Kartoffelpflanzen mit verringerter Aktivität der mitochondrialen Serinhydroxymethyltransferase. Diplomarbeit. Universität Rostock Abteilung Pflanzenphysiologie
- Ewald R, Kolukisaoglu U, Bauwe U, Mikkat S et al.**, (2007) Mitochondrial protein lipoylation does not exclusively depend on the mtKAS pathway of de novo fatty acid synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**: 41-48
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 455-484
- Fujiwara K, Hosaka H, Matsuda M, Okamura-Ikeda K et al.**, (2007) Crystal structure of bovine lipoyltransferase in complex with lipoyl-AMP. *J Mol Biol* **371**: 222-234
- Fujiwara K, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y** (1997) Cloning and expression of a cDNA encoding bovine lipoyltransferase. *J Biol Chem* **272**: 31974-31978
- Fujiwara K, Takeuchi S, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y** (2001) Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 28819-28823
- Fujiwara K, Toma S, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y et al.**, (2005) Crystal structure of lipoate-protein ligase A from *Escherichia coli*. Determination of the lipoic acid-binding site. *J Biol Chem* **280**: 33645-33651
- Gambonnet B, Jabrin S, Ravanel S, Karan M et al.**, (2001) Folate distribution during higher plant development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 835-841
- Garganta CL, Wolf B** (1990) Lipoamidase activity in human serum is due to biotinidase. *Clinica Chimica Acta* **189**: 313-326
- Gould SB, Waller RR, McFadden GI** (2008) Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 491-517
- Graham IA, Eastmond PJ** (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research* **41**: 156-181
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R et al.**, (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 5016-5025
- Guerra DJ, Ohlrogge JB, Frentzen M** (1986) Activity of acyl carrier protein isoforms in reactions of plant fatty-acid metabolism. *Plant Physiology* **82**: 448-453
- Günther S, Storm J, Müller S** (2009) *Plasmodium falciparum*: Organelle-specific acquisition of lipoic acid. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**: 748-752
- Günther S, Wallace L, Patzewitz EM, McMillan PJ et al.**, (2007) Apicoplast lipoic acid protein ligase B is not essential for *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* **3**: e189
- Hackenberg C, Engelhardt A, Matthijs HC, Wittink F et al.**, (2009) Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O₂ cooperate in high-light acclimation of *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *Planta* **230**: 625-637
- Hanson AD, Gregory JF** (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 244-249

- Hardie DG, McCarthy AD** (1984) Evolution of mammalian fatty-acid synthase by gene fusion. *Journal of the American Oil Chemists Society* **61**: 661-662
- Hasse D, Mikkat S, Hagemann M, Bauwe H** (2009) Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase. *Febs Journal* **276**: 6985-6991
- Hayden MA, Huang I, Bussiere DE, Ashley GW** (1992) The biosynthesis of lipoic acid - cloning of Lip, a lipoate biosynthetic locus of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 9512-9515
- Hayden MA, Huang IY, Iliopoulos G, Orozco M et al.**, (1993) Biosynthesis of lipoic acid - characterization of the lipoic acid auxotrophs *Escherichia coli* W1485-Lip2 and Jrg33-Lip9. *Biochemistry* **32**: 3778-3782
- Heldt HW** (2003) Pflanzenbiochemie 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH ISBN 3-8274-1330-3
- Herbert AA, Guest JR** (1968) Biochemical and genetic studies with lysine + methionine mutants of *Escherichia coli* - lipoic acid and alpha-ketoglutarate dehydrogenase-less mutants. *Journal of General Microbiology* **53**: 363-&
- Hermes FAM, Cronan JE** (2009) Scavenging of cytosolic octanoic acid by mutant LplA lipoate ligases allows growth of *Escherichia coli* strains lacking the LipB octanoyltransferase of lipoic acid synthesis. *Journal of Bacteriology* **191**: 6796-6803
- Hiltunen JK, Schonauer MS, Autio KJ, Mittelmeier TM et al.**, (2009) Mitochondrial fatty acid synthesis type II: More than just fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 9011-9015
- Husic DW, Husic HD, Tolbert NE** (1987) The oxidative photosynthetic carbon-cycle or C2 cycle. *Crc Critical Reviews in Plant Sciences* **5**: 45-100
- Jiang YF, Cronan JE** (2005) Expression cloning and demonstration of *Enterococcus faecalis* lipoamidase (pyruvate dehydrogenase inactivase) as a Ser-Ser-Lys triad amidohydrolase. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 2244-2256
- Jordan SW, Cronan JE, Jr.** (2003) The *Escherichia coli* lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein:protein transferase. *J Bacteriol* **185**: 1582-1589
- Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bligny R et al.**, (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* **167**: 863-874
- Kang SG, Jeong HK, Lee E, Natarajan S** (2007) Characterization of a lipoate-protein ligase A gene of rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **393**: 53-61
- Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M et al.**, (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ et al.**, (2000) The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* **123**: 497-508
- Keech O, Dizengremel P, Gardestrom P** (2005) Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **124**: 403-409
- Keys AJ** (2006) The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C-3 higher plants. *Photosynthesis Research* **87**: 165-175
- Kim DJ, Lee SJ, Kim HS, Kim KH et al.**, (2008a) Structural basis of octanoic acid recognition by lipoate-protein ligase B. *Proteins* **70**: 1620-1625
- Kim DJ, Kim KH, Lee HH, Lee SJ et al.**, (2005) Crystal structure of lipoate-protein ligase A bound with the activated intermediate: insights into interaction with lipoyl domains. *J Biol Chem* **280**: 38081-38089
- Kim HU, van Oostende C, Basset GJC, Browse J** (2008b) The AAE14 gene encodes the *Arabidopsis* o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phylloquinone synthesis and photosystem-I function. *Plant Journal* **54**: 272-283
- Konieczny A, Ausubel FM** (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal* **4**: 403-410
- Koo AJK, Chung HS, Kobayashi Y, Howe GA** (2006) Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 33511-33520
- Koo AJK, Fulda M, Browse J, Ohlrogge JB** (2005) Identification of a plastid acyl-acyl carrier protein synthetase in *Arabidopsis* and its role in the activation and elongation of exogenous fatty acids. *Plant Journal* **44**: 620-632
- Koo AJK, Ohlrogge JB, Pollard M** (2004) On the export of fatty acids from the chloroplast. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 16101-16110
- Koufaki M, Detsi A, Kiziridi C** (2009) Multifunctional lipoic acid conjugates. *Current Medicinal Chemistry* **16**: 4728-4742

- Kozaki A, Takeba G** (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**: 557-560
- Kunz HH, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I et al.**, (2009) The ABC transporter PXA1 and peroxisomal beta-oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* **21**: 2733-2749
- Labadorf A, Link A, Rogers MF, Thomas J et al.**, (2010) Genome-wide analysis of alternative splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bmc Genomics* **11**: 114
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**: 680-&
- Lernmark U, Gardestrom P** (1994) Distribution of pyruvate-dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. *Plant Physiology* **106**: 1633-1638
- Lin M, Behal R, Oliver DJ** (2003) Disruption of pLE2, the gene for the E2 subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex, in *Arabidopsis* causes an early embryo lethal phenotype. *Plant Molecular Biology* **52**: 865-872
- Lutziger I, Oliver DJ** (2001) Characterization of two cDNAs encoding mitochondrial lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 615-623
- Ma Q, Zhao X, Nasser EA, Geerlof A et al.**, (2006) The *Mycobacterium tuberculosis* LipB enzyme functions as a cysteine/lysine dyad acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8662-8667
- Martin N, Christensen QH, Mansilla MC, Cronan JE et al.**, (2011) A novel two-gene requirement for the octanoyltransfer reaction of *Bacillus subtilis* lipoic acid biosynthesis. *Molecular Microbiology* **80**: 335-349
- Mccarthy AD, Hardie DG** (1984) Fatty-acid synthase - an example of protein evolution by gene fusion. *Trends in Biochemical Sciences* **9**: 60-63
- McManus E, Luisi BF, Perham RN** (2006) Structure of a putative lipoate protein ligase from *Thermoplasma acidophilum* and the mechanism of target selection for post-translational modification. *J Mol Biol* **356**: 625-637
- Meyer EH, Heazlewood JL, Millar AH** (2007) Mitochondrial acyl carrier proteins in *Arabidopsis thaliana* are predominantly soluble matrix proteins and none can be confirmed as subunits of respiratory Complex I. *Plant Mol Biol* **64**: 319-327
- Millar AH, Leaver CJ** (2000) The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria. *Febs Letters* **481**: 117-121
- Moreno JI, Martin R, Castresana C** (2005) *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant Journal* **41**: 451-463
- Morris TW, Reed KE, Cronan JE, Jr.** (1994) Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the lplA gene and gene product. *J Biol Chem* **269**: 16091-16100
- Morris TW, Reed KE, Cronan JE, Jr.** (1995) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the lplA and lipB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J Bacteriol* **177**: 1-10
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-&
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C** (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 463-470
- Norman EG, Colman B** (1991) Purification and characterization of phosphoglycolate phosphatase from the cyanobacterium *Coccochloris peniocystis*. *Plant Physiology* **95**: 693-698
- Ohlrogge JB, Kuhn DN, Stumpf PK** (1979) Subcellular-localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1194-1198
- Oliver DJ** (1994) The glycine decarboxylase complex from plant-mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 323-337
- Oliver DJ, Raman R** (1995) Glycine decarboxylase - protein chemistry and molecular-biology of the major protein in leaf mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **27**: 407-414
- Olsen JG, Rasmussen AV, von Wettstein-Knowles P, Henriksen A** (2004) Structure of the mitochondrial beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase from *Arabidopsis* and its role in fatty acid synthesis. *Febs Letters* **577**: 170-174
- Packer L, Tritschler HJ** (1996) Alpha-lipoic acid: The metabolic antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* **20**: 625-626

- Perez-Lopez U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C et al.**, (2010) Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* **139**: 256-268
- Perham RN** (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: Catalytic machines for multistep reactions. *Annu Rev Biochem* **69**: 961-1004
- Pollmann S, Neu D, Lehmann T, Berkowitz O et al.**, (2006) Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**: 1241-1253
- Posner MG, Upadhyay A, Bagby S, Hough DW et al.**, (2009) A unique lipoylation system in the archaea lipoylation in *Thermoplasma acidophilum* requires two proteins. *Febs Journal* **276**: 4012-4022
- Prabhu V, Chatson KB, Abrams GD, King J** (1996) C-13 nuclear magnetic resonance detection of interactions of serine hydroxymethyltransferase with C1-tetrahydrofolate synthase and glycine decarboxylase complex activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **112**: 207-216
- Rajinikanth M, Harding SA, Tsai CJ** (2007) The glycine decarboxylase complex multienzyme family in *Populus*. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1761-1770
- Reed KE, Cronan JE, Jr.** (1993) Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: Sequencing and functional characterization of the lipA and lipB genes. *J Bacteriol* **175**: 1325-1336
- Reed LJ, Koike M, Levitch ME, Leach FR** (1958a) Studies on the nature and reactions of protein-bound lipoic acid. *Journal of Biological Chemistry* **232**: 143-158
- Reed LJ, Leach FR, Koike M** (1958b) Studies on a lipoic acid-activating system. *Journal of Biological Chemistry* **232**: 123-142
- Reumann S, Weber APM** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled - others remain. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 1496-1510
- Rock CO** (2009) Opening a new path to lipoic acid. *Journal of Bacteriology* **191**: 6782-6784
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Kissinger JC et al.**, (1999) Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 426-432
- Rylott EL, Eastmond PJ, Gilday AD, Slocombe SP et al.**, (2006) The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment. *Plant Journal* **45**: 930-941
- Salvi D, Rolland N, Joyard J, Ferro M** (2008) Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Methods Mol Biol* **432**: 345-356
- Schagger H** (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**: 16-22
- Schjoerring JK, Mack G, Nielsen KH, Husted S et al.**, (2006) Antisense reduction of serine hydroxymethyltransferase results in diurnal displacement of NH₄⁺ assimilation in leaves of *Solanum tuberosum*. *Plant Journal* **45**: 71-82
- Schonauer MS, Kastaniotis AJ, Kursu VAS, Hiltunen JK et al.**, (2009) Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 23234-23242
- Schuller KA, Randall DD** (1989) Regulation of pea mitochondrial pyruvate-dehydrogenase complex - does photorespiratory ammonium influence mitochondrial carbon metabolism. *Plant Physiology* **89**: 1207-1212
- Sgherri C, Quartacci MF, Izzo R, Navari-Izzo F** (2002) Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 591-597
- Shockey JM, Fulda MS, Browse J** (2003) *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases. *Plant Physiol* **132**: 1065-1076
- Shrestha R, Dixon RA, Chapman KD** (2003) Molecular identification of a functional homologue of the mammalian fatty acid amide hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 34990-34997
- Somerville CR** (2001) An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiology* **125**: 20-24
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) Phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* **280**: 833-836
- Somerville CR, Ogren WL** (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2684-2687
- Somerville CR, Ogren WL** (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol* **67**: 666-671
- Somerville CR, Ogren WL** (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem J* **202**: 373-380

- Souza CD, Barbazuk B, Ralph SG, Bohlmann J et al.**, (2008) Genome-wide analysis of a land plant-specific acyl : coenzymeA synthetase (ACS) gene family in *Arabidopsis*, poplar, rice and *Physcomitrella*. *New Phytologist* **179**: 987-1003
- Spalding MD, Prigge ST** (2009) The amidase domain of lipoamidase specifically inactivates lipoylated proteins *in vivo*. *Plos One* **4**:
- Spalding MD, Prigge ST** (2010) Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**: 200-+
- Srinivasan R, Oliver DJ** (1992) H-protein of the glycine decarboxylase multienzyme complex - complementary-DNA encoding the protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **98**: 1518-1519
- Suzuki K, Reed LJ** (1963) Lipoamidase. *Journal of Biological Chemistry* **238**: 4021-&
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M** (2007) The photorespiratory pathway is important for the repair of photodamaged photosystem II under CO₂ limiting conditions. *Photosynthesis Research* **91**: 209
- Taylor NL, Day DA, Millar AH** (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 42663-42668
- Timm S, Nunes-Nesi A, Pamik T, Morgenthal K et al.**, (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2848-2859
- Tolbert NE** (1997) The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 1-23
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E et al.**, (2005) The botany array resource: E-northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant Journal* **43**: 153-163
- Tovar-Mendez A, Miernyk JA, Randall DD** (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry* **270**: 1043-1049
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S et al.**, (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* **139**: 806-821
- Voll LM, Jamai A, Renne P, Voll H et al.**, (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* shm1 mutant is deficient in SHM1. *Plant Physiology* **140**: 59-66
- Wada H, Shintani D, Ohlrogge J** (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1591-1596
- Wada M, Yasuno R, Jordan SW, Cronan JE, Jr. et al.**, (2001a) Lipoic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*: Cloning and characterization of a cDNA encoding lipoyltransferase. *Plant Cell Physiol* **42**: 650-656
- Wada M, Yasuno R, Wada H** (2001b) Identification of an *Arabidopsis* cDNA encoding a lipoyltransferase located in plastids. *FEBS Lett* **506**: 286-290
- Wendt UK, Wenderoth I, Tegeler A, von Schaewen A** (2000) Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* **23**: 723-733
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC** (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **355**: 1517-1529
- Xiao S, Chye ML** (2009) An *Arabidopsis* family of six acyl-CoA-binding proteins has three cytosolic members. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 479-484
- Xu CC, Moellering ER, Muthan B, Fan JL et al.**, (2010) Lipid transport mediated by *Arabidopsis* TGD proteins is unidirectional from the endoplasmic reticulum to the plastid. *Plant and Cell Physiology* **51**: 1019-1028
- Yasuno R, von Wettstein-Knowles P, Wada H** (2004) Identification and molecular characterization of the beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase component of the *Arabidopsis* mitochondrial fatty acid synthase. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 8242-8251
- Yasuno R, Wada H** (1998) Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: Cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiol* **118**: 935-943
- Yasuno R, Wada H** (2002) The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **517**: 110-114
- Zhao X, Miller JR, Cronan JE** (2005) The reaction of LipB, the octanoyl-[acyl carrier protein]:protein N-octanoyltransferase of lipoic acid synthesis, proceeds through an acyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* **44**: 16737-16746

Zhao X, Miller JR, Jiang Y, Marletta MA et al., (2003) Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chem Biol* **10**: 1293-1302

7 Anhang

7.1 Anhang Material und Methoden

Tabelle 7.1 Verwendete T-DNA-Insertionsmutanten

T-DNA-Insertions-Mutanten	Gen-Lokus	Ökotyp	Nummer	Kollektion	Literatur
<i>Atmtkas-1</i>	At2g04540	Col	-	Somerville	(Somerville and Ogren, 1982; Ewald et al., 2007)
<i>Atmtkas-2</i>	At2g04540	Col-0	SALK_022295	SALK	(Ewald et al., 2007)
<i>Atmtkas-3</i>	At2g04540	Col-0	SALK_087186	SALK	(Ewald et al., 2007)
<i>Atlip2-1</i>	At1g04640	Col-0	SAIL_662_H11	SAIL	-----
<i>AtlipA-1</i>	At3g29010	Col-0	SALK_003427	SALK	-----
<i>Atlip2p-1</i>	At4g31050	Col-0	SALK_031372	SALK	-----
<i>Atlip2p-2</i>	At4g31050	Col-0	SALK_085456	SALK	-----
<i>Atlip1p-1</i>	At5g08415	Col-0	SALK_024724	SALK	-----
<i>Atlip2p2-1</i>	P0C7R2	Col-0	SALK_038140	SALK	-----

Tabelle 7.2 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Stock-Nummer	Sequenz 5'-3' (Restriktionsschnittstellen unterstrichen)
40S16forward	R176	GGC GAC ACA ACC AGC TAC TGA
40S16revers	R177	CGG TAA CTC TTC TGG TAA CGA
mLB1	R741	AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG AA
SALK-RB1	R409	ATT AAA CTC CAG AAA CCC GCG GCT GAG
04540-A1	R758	ACACAAGTTTAGATAGAGGCAAAGAG
04540-S2	R759	AAA AGT CCC ATC ATC GCC GTC GTC TC
04540-A3	R790	ATG CCA AGG TGC CTG AAG TAG CAT G
04540-A4	R791	GTT GGT AAC CAC TCT GCA TCT CTC
04540-S3	R793	AAA CAT GGC ATC TGG TCA TGT GAG
04540-A2	R794	GCC GTG AAG CTT CTT GTG GAG AAG
04540-S4	R795	CTG AGC TTT GTG GAT ATG GGA TGT C
mtKAS-2A	R833	TTA TTG TGA GAT CGT GAC TAT GAA G

AtLPLA-S	P189	GTA AGC TTC TCT TCT TAT T
AtLPL-A	P190	CAT CAT TAA CAA TGC ACC
AtLPLA-S2	P321	GTA AGT TCG GTG GGA ATG CTC
AtLPLA-A2	P322	CCA TTG CTT CTT CGA GTT CTT C
AtLPLA-XhoI	R1063	GCC TCG AGA TGA GTT TAA GTA GAG CAA AGG A
AtLPLA-BamHI	R1062	GCG GAT CCA TGA GTT TAA GTA GAG CAA AGG A
AtLPLA-HindIII	R1068	GCA AGC TTT CAT GTG TTT TGA ATG GTA TCA G
LIP2-RNAi-BamHI-5'	P129	AAGGATCCGGAGAAATTAGTTTCAGAGAG
LIP2-RNAi-Sall-3'	P130	AAGTCGACGCTTTCACGCCATAAATCGAA
LIP2-RNAi-BglII-5'	P131	AAA GAT CTG GAG AAA TTA GTT TCA GAG AG
LIP2-RNAi-XhoI-3'	P132	AAC TCG AGG CTT TCA CGC CAT AAA TCG AA
AtLPLA-RNAi-BglII-5'	P222	GCA GAT CTA TGA GTT TAA GTA GAG CAA AGG A
AtLPLA-RNAi-Sall-3'	P223	GCG TCG ACC ATC ATC CTT GTT AGA AAT CAA AC
AtLPLA-RNAi-XhoI-3'	P224	GCC TCG AGC ATC ATC CTT GTT AGA AAT CAA AC
35S-NotI-S	R1069	CAG CGG CCG CGA TAT CGT ACC CCT ACT CCAAAA A
35S-NotI-A	R1070	CAG CGG CCG CGA TAT CGA TCT GGA TTT TAG TAC
AtLIP2-BamHI	R1058	CGG GAT CCA TGA GAT CCC CTA GAA CCT TGG
AtLIP2-HindIII	R1102	CGA AGC TTT TAT TCT TTA TCT TGG GTG TCC
AtLIP2-S	R982	CTA ATC TGG AGA GAA CCT ATC TCT G
AtLIP2-A	R983	GTG ATT CCA GAA GAT ATC CTA ACC
Bar-Antisense	R1044	GCT GAA GTC CAG CTG CCA GAA ACC
LIP2p-S1	R1001	GGT CAT GGC AGA AGA GCA TTG TCG
LIP2p-A1	R1014	CAC CTT CCT TTT AGC ACT CCA ATC G
AtLIP2p-S2	P238	GCA GGT GCC TGT GTT TTG ATC TTT
AtLIP2p-A2	P239	ACA TTA TTA CCT GAC CAG GGC CAT
AtLIP2p2-S-SacI	P196	AAG AGC TCA TGG TTT TTT CCG TTG CAA CAA GC
AtLIP2p2-A-Sall	P199	AAG TCG ACT CAG CAT TCC AAT TTG AAT ACT GT
AtLIP2p2-S1	P211	GTT GCA ACA AGC TCT GTT ACG
AtLIP2p2-A2	P229	CAG CAT TCC AAT TTG AAT ACT G
LIP2p2GFP-S	P439	AA TCT AGA ATG GTT TTT TCC GTT GCA ACA
LIP2p2GFP-A	P440	TT CTC GAG CTC TTG GTT TTT ATC AAT CAA
At5g55070-BamHI-S	P220	AAG GAT CCA TGA TGT TGC GTG CTG TTT TTA GG
At5g55070-HindIII-A	P221	AAA AGC TTT CAT ATG TCG AGA AGA AGC CTC T
AtGLDH1-BamHI-S	P213	AAG GAT CCA TGT CCA CAG TTT TGG AGG GT
AtGLDH1-Sall-A	P214	AAG TCG ACC TAG TGA GCA GCA TCT TCC TC
OsLPLA-cds-BamHI-S	Hag341	GCG GAT CCA TGG CCG CTG GGG TGG CTG GAG CG
OsLpLA-cds-HindIII-A	Hag340	GCAAGCTTTCATGCTTCGACTTCCTGTACCTTGAGTG

Tabelle 7.3 Heterolog exprimierte Proteine

Protein	Primerkombination	Schnittstellen	Expressionsvektor
AtLPLA (At3g29010)	R1062/R1068 R1063/R1068 R1064/R1068	BamHI/HindIII XhoI/HindIII NdeI/HindIII	pASK-IBA7plus pBAD-HisA pET-28a
OsLPLA (EF015469)	Hag341/Hag340	BamHI/HindIII	pASK-IBA7plus
EcLPLA-CTD 85AA C-Terminus von AAA21740	P262/P264	BamHI/HindIII	pASK-IBA7plus
AtLIP2 (At1g04640)	R1058/R1102	BamHI/HindIII	pASK-IBA7plus
AtLIP2p2 (P0C7R2)	P196/P199	SacI/Sall	pASK-IBA7plus

Tabelle 7.4 Verwendete Antikörper

Verwendete Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti rabbit IgG-Peroxidase	1:5000	BioRad
LA (monoclonal anti-lipoate IgG)	1:2000	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Anti H-protein	1:2000	Kopriva et al., 1996
Anti T-protein	1:1000	PUR (Pflanzenphysiologie Universität Rostock)
Anti Glycerate-Kinase (<i>Oryza sativa</i>)	1:2500	PUR
Strep-Tactin® conjugated to alkaline phosphatase	1:5000	IBA BioTAGnology
Anti AtLPLA	1:500 (gereinigt)	diese Arbeit
Anti AtLIP2p2	1:500 (gereinigt)	diese Arbeit
Anti AtLIP2	1:2000 bzw. 1:500 (gereinigt)	diese Arbeit
Anti-His-HRP	1:5000	Miltenyi Biotec GmbH
Anti-RBCL (<i>Nicotiana tabacum</i>)	1:5000	Freundliche Gabe von Elfriede Pistorius (Universität Bielefeld)

7.2 Anhang Ergebnisse

7.2.1 P0C7R2 Sequenz

	10	20	30	40	50	60	70
genomic DNA						
P0C7R2 cds	cttcttcgaaatttctaagccttaaagtttgataatttatctcgaaagacatgggtttttccggtgcaac						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	80	90	100	110	120	130	140
genomic DNA						
P0C7R2 cds	aagctctgttacgaacccaaagctccatcatcaccaccatcttagtgacttcaacagaaacagagtatct						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	150	160	170	180	190	200	210
genomic DNA						
P0C7R2 cds	acatctctcaagataatgaactcgaagaatcacacaaaccaagaaagtaatgttcctctctctttatct						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	220	230	240	250	260	270	280
genomic DNA						
P0C7R2 cds	tctctttgaggaattttaacgaacacgttacgtgcattcttcaacaatgcataacagagtatacatcttt						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	290	300	310	320	330	340	350
genomic DNA						
P0C7R2 cds	acaggtgtgagtgttttgatctctacgatcaattaattccatacaagaaagcttggtcatggcaaaaag						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	360	370	380	390	400	410	420
genomic DNA						
P0C7R2 cds	-----TG TGAGTGT TTTGATCTCTACGATCAATTAATTCCATACAAGAAAGCTTGGTCATGGCAAAAAG						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	430	440	450	460	470	480	490
genomic DNA						
P0C7R2 cds	cattctcaatgagaaaaagcctttgattgataaaaaccaagagtgttcagattcattaattatactacaa						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----						
	430	440	450	460	470	480	490
genomic DNA						
P0C7R2 cds	catccttctgtttacacaatgggaactggaagctcagagaattatctcaatttcgacataaagaatgctc						
P0C7R1 cds	-----						
Atlg47580 cds	-----ATGGGAAGCTGGAAGCTCAGAGAATTATCTCAATTTTCGACATAAAGAATGCTC						


```

          500      510      520      530      540      550      560
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    ctttcgatgtttatagaacagaacgtgggtggtgaagttacttatcatggctcctggtcaggtaaaacacaa
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds CTTTCGATGTTTATAGAACAGAACGTGGTGGTGAAGTTACTTATCATGGTCCTGGTCAG-----

          570      580      590      600      610      620      630
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    tgagtctcctttgttttcttctcaaattcatcaatattgaagctaattggtttgtcaatgaatgtgaaatg
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds -----

          640      650      660      670      680      690      700
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    ---CTAGTTATGTATCCTATAATCAATCTACGGAATCACAAAATGGATCTTCATTGGTACTTAAGGAAGC
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds -----C

          710      720      730      740      750      760      770
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    TTGAGGAAGTAGTTATTCGTGTTCTTTCTTCGGCTTCGCCATCAATGCTTCTCGTCTCGACGGTTTTAC
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds TTGAGGAAGTAGTTATTCGTGTTCTTTCTTCGGCTTCGCCATCAATGCTTCTCGTCTCGACGGTTTTAC

          780      790      800      810      820      830      840
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    TGGAGTTTGGGTTG-----
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds TGGAGTTTGGGTTG-----

          850      860      870      880      890      900      910
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    -----GCAACAAAAAATGGCGGCGATAGGTATTCGTGTGTCGAAATGG
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds -----GCAACAAAAAATGGCGGCGATAGGTATTCGTGTGTCGAAATGG

          920      930      940      950      960      970      980
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    ATGACATATCACGGTCTAGCTCTTAATGTTACAACAGATTTAACACCCTTTAACTCCATAGTTCATGTG
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds ATGACATATCATGGTCTAGCTCTTAATGTTACAACAGATTTAACACCCTTTAACTCCATAGTTCATGTG

          990      1000     1010     1020     1030     1040     1050
genomic DNA   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds    GGATAAGGAACCGTGGGGTTGGAAGCGTAAAGGGTTTGATTGAGGATGGAGAACATTATAATAAGCTTGA
P0C7R1 cds    -----
Atlg47580 cds GGATAAGGAACCGTGGGGTTGGAAGCGTAAAGGGTTTGATTGAGGATGGAGAACATTATAATAAGCTTGA

```

```

          1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      agatttgcagttgtagatatagctcatgagtcggttactaaaggaattctctgaagtttttcagcttcag
P0C7R1 cds      -----
Atlg47580 cds    AGATTTCAGTTGTTAGATATAGCTCATGAGTCGTTACTAAAGGAATTCTCTGAAGTTTTTCAGCTTCAG

          1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      atggaagcaaacagcattcaaatggaatgctgaaggattttgtggttcttacttagcttacaagtga
P0C7R1 cds      ATGGAAGCAACAGTATTCAAATTGGAATGCTGA
P0C7R1 cds      -----
Atlg47580 cds    ATGGAAGCAACA-----

          1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      ttatgggatggtggttatgcaggaaacctttgtggaccagtgattttattggcagtttgtaagtgtg
P0C7R1 cds      -----
Atlg47580 cds    -----

          1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      ttgttttctgtagatatgtgtgtgagagatttgatttctctatttctctctccaaagaaagcttatctg
P0C7R1 cds      -----
Atlg47580 cds    -----AGATTTGATTCTCTATTTCTCTCTCCAAAGAAAGCTTATCTG

          1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      cttcttggaattgaccacaaagggatggctctggaagctgctttctccatgagtttttgctccttctctgt
P0C7R1 cds      -----ATGGCTCTGGAAGCTGCTTTCTCCATGAGTTTTTGCTCCTTCTCTGT
Atlg47580 cds    CTCTCTGGATTGACCACAAAGGGATGGCTCTGGAAGCTGCTTTCTCCATGAGTTTTTGCTCCTTCTCTGT

          1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      ccctaaagcaatcttctgtgagagagaaacttcatcttttcaacgaatcacctcgagagcaaaggaatt
P0C7R1 cds      CCCTAAAGCAATCTTCTGTGAGAGAGAACTTCATCTTTTCAACGAATCACCTCGAGAGCAAAGGGAATT
Atlg47580 cds    CCCTAAAGCAATCTTCTGTGAGAGAGAACTTCATCTTTTCAACGAATCACCTCGAGAGCAAAGGGAATT

          1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      gcgggtgagagtcaagttcaaagctctgatggagttgagactcaagtcaaggaaacttctccaaagtat
P0C7R1 cds      GCGGGTGAGAGTCAAGTTCAAAGCTCTGATGGAGTTGAGACTCAAGTCAAGGAACTTCTCCAAAGTAT
Atlg47580 cds    GCGGGTGAGAGTCAAGTTCAAAGCTCTGATGGAGTTGAGACTCAAGTCAAGGAACTTCTCCAAAGTAT

          1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
genomic DNA      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
P0C7R2 cds      ttgataaactgcctgaaagaaatttagatacttgagcggtggcagagaaacagcaagaggactttcagg
P0C7R1 cds      TTGATAAACTGCCTGAAAGAAATTTAGATACTTGAGCGGTGGCAGAGAAACAGCAAGAGGACTTTCAGG
Atlg47580 cds    TTGATAAACTGCCTGAAAGAAATTTAGATACTTGAGCGGTGGCAGAGAAACAGCAAGAGGACTTTCAGG

```

	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
						
genomic DNA	ttcagtagtaagaacactgtacgaaaagatactactttacgacatatctcaccttctagtcattcaaca						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	TTCAGTAGTAAGAAACACTGTACGAAAAGATACTACTTTACGACATATCTCACCTTCTAGTCATTCAACA						
Atlg47580 cds	TTCAGTAGTAAGAAACACTGTACGAAAAGATACTACTTTACGACATATCTCACCTTCTAGTCATTCAACA						
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
						
genomic DNA	aaggttagaggagataagccagagatttcagggggtgagaagaaagctattgtagatagaagcaaggcct						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	AAGGTTAGAGGAGATAAGCCAGAGATTTACGGGGTGAGAAGAAAGCTATTGTAGATAGAAGCAAGGCCT						
Atlg47580 cds	AAGGTTAGAGGAGATAAGCCAGAGATTTACGGGGTGAGAAGAAAGCTATTGTAGATAGAAGCAAGGCCT						
	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
						
genomic DNA	acgtaaagctgaaatccttagggaaagaagtgagagacgcaggctatgtaccagagactaagtatgttct						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	ACGTAAAGCTGAAATCTTTAGGGAAAGAAGTGAGAGACGCAGGCTATGTACCAGAGACTAAGTATGTTCT						
Atlg47580 cds	ACGTAAAGCTGAAATCTTTAGGGAAAGAAGTGAGAGACGCAGGCTATGTACCAGAGACTAAGTATGTTCT						
	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
						
genomic DNA	tcacgacattgatgaagaagctaagagaaagccttgatgcatcatagtgaacggttagctattgctttc						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	TCACGACATTGATGAAGAAGCTAAAGAGAAAGCCTTGATGCATCATAGTGAACGGTTAGCTATTGCTTTC						
Atlg47580 cds	TCACGACATTGATGAAGAAGCTAAAGAGAAAGCCTTGATGCATCATAGTGAACGGTTAGCTATTGCTTTC						
	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
						
genomic DNA	gggattataaacactcctccaggagcagacaataaggggtgatgaagaatctgaggatatgtggagattgcc						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	GGGATTATAAACACTCCTCCAGGGACGACAATAAGGGTGATGAAGAATCTGAGGATATGTGGAGATTGCC						
Atlg47580 cds	GGGATTATAAACACTCCTCCAGGGACGACAATAAGGGTGATGAAGAATCTGAGGATATGTGGAGATTGCC						
	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
						
genomic DNA	ataacttcataaagatattatcgagtatcgaagatagagagatcattgtaagagataacaagaggttcca						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	ATAACTTCATAAAGATATTATCGAGTATCGAAGATAGAGAGATCATTGTAAGAGATAACAAGAGGTTCCA						
Atlg47580 cds	ATAACTTCATAAAGATATTATCGAGTATCGAAGATAGAGAGATCATTGTAAGAGATAACAAGAGGTTCCA						
	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
						
genomic DNA	tcatttttagagatggtaactgctcttgtggagattattggttagacttttgtattaaaagatgtgaaattc						
P0C7R2 cds							
P0C7R1 cds	TCATTTTAGAGATGGTAACTGCTCTTGTGGAGATTATTGGTAG						
Atlg47580 cds	TCATTTTAGAGATGGTAACTGCTCTTGTGGAGATTATTGGTAG						

7.2.2 LTA2-Bande im Western Blot mit LA-Antikörper

In Western Blots mit dem Liponsäure-Antikörper erschien oftmals eine Bande, welche sich zwischen der KGDH E2-Untereinheit (At5g55070) und der PDH-E2b-Untereinheit (At3g13930) befand. Zwei lipoylierte Proteine (BCDH E2-Untereinheit At3g06850 und LTA2 = E2-Untereinheit der plastidären PDH) haben eine Größe, die für diese Bande in Frage kam. Laut Literatur unterscheiden sich die errechneten Größen und das Laufverhalten im SDS-Gel dieser Proteine um einige kDa. So liegt die errechnete Größe der BCDH E2-Untereinheit bei 52,7 kDa, im SDS-Gel wurde die Bande allerdings bei 51 kDa nachgewiesen. Das LTA2 Protein hat eine errechnete Größe von 50,079 kDa läuft jedoch auf der Höhe von ca. 55 kDa. Die E2-Untereinheit der KGDH weist eine errechnete Masse von 50,13 kDa auf und wurde auf einer Höhe von ca. 52 kDa im Gel detektiert (Yasuno et al., 2004). Aufgrund dieser Widersprüche und aufgrund der Tatsache, dass Yasuno et al. nur isolierte Mitochondrienproteinextrakte verwendeten, wurden eigene Western Blots mit Blatt-, Wurzel- und Mitochondrienextrakten von *Arabidopsis* Wildtyppflanzen und mtKAS-Mutanten näher betrachtet. Aus diesen Western Blots wird ersichtlich, dass die Bande zwischen KGDH-E2 und PDH-E2 sowohl in Blatt- und Wurzelproteinextrakten wiederzufinden ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Bandenstärke in mtKAS-Mutanten nicht abnimmt. In *mtkas* Mitochondrien konnte keine dritte Bande zwischen KGDH-E2 und PDH-E2b detektiert werden, was jedoch bei Blatt- und Wurzelextrakten der Fall war. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Proteinlipoylierung im Blatt vorrangig von Octanoyl-ACP, welches von mtKAS synthetisiert wird, abhängig ist. Die Befunde, dass die Bandenstärke der zu identifizierenden Bande in *mtkas* Blatt- und Wurzelextrakten nicht abnimmt, sowie das Fehlen dieser Bande in Mitochondrienextrakten lassen nur den Schluss zu, dass es sich hierbei um die E2-Untereinheit der plastidären Pyruvat-Dehydrogenase handelt.

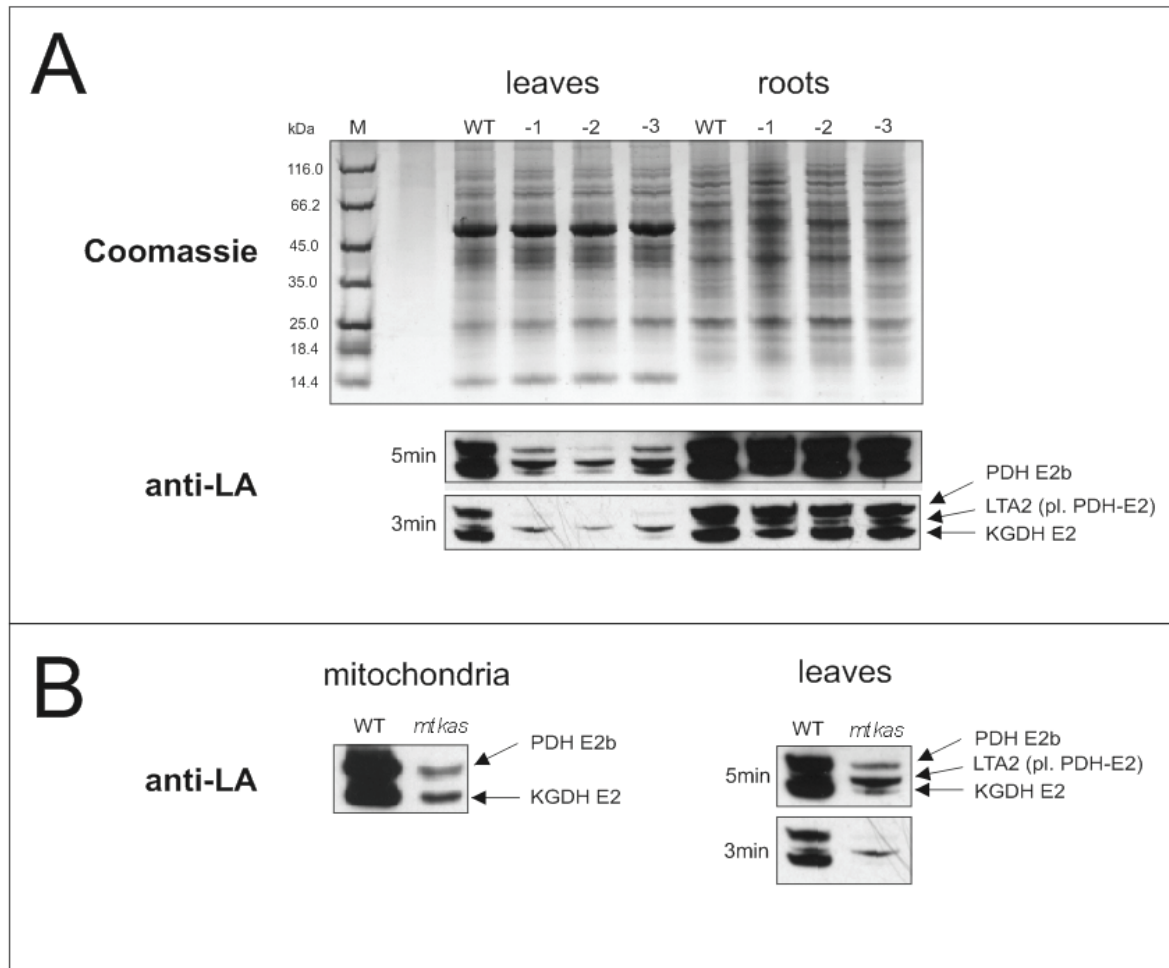


Abbildung 7.1 Identifizierung der LTA2-Bande in Western Blots mit LA-Antikörper

A: Western Blot mit je 5 µg Blatt- und Wurzelprotein von Wildtyp (WT), *mtkas-1* (-1), *mtkas-2* (-2) und *mtkas-3* (-3). Die Entwicklung des Western Blot erfolgte mit dem primären Antikörper gegen Liponsäure (anti-LA) und den sekundären Antikörper Peroxidase mittels Chemilumineszenzdetektion. Hierbei wurde der ECL-Film 5 Minuten (5 min) bzw. 3 Minuten (3 min) auf die Membran aufgelegt um verschiedene Belichtungsstärken zu erhalten. Als Ladekontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmengen diente ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

B: Western Blots mit Mitochondrienextrakt (5 µg) und Blattextrakt (5 µg) von Wildtyp und *mtkas-1* (*mtkas*) mit LA-Antikörper.

7.2.3 LIP2p-Spliceformen

Zur Klärung der Doppelbande, welche bei der RT-PCR (Primerkombination R1001/R1014) zum Nachweis des LIP2p-Transkripts auftrat (Abbildung 3.49, D) wurden die PCR-Fragmente durch verlängerte Laufzeit im Gel weiter separiert, ausgeschnitten, aus dem Agarosegel eluiert und mit dem Primer R1001 zur Sequenzierung (Seqlab) verschickt. Hierbei wurden beide Banden je zweimal sequenziert (obere Bande Sequenzierungsnummer 46, 47; untere Bande Sequenzierungsnummer 50, 51). Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei der oberen Bande um das erwartete PCR-Fragment (LIP2p-cDNA) handelte. Bei der unteren Bande handelte es sich ebenfalls um LIP2p-cDNA, jedoch fehlten 62 bp. Es handelt sich demnach um eine weitere, bisher nicht beschriebene Spliceform der LIP2p-mRNA.

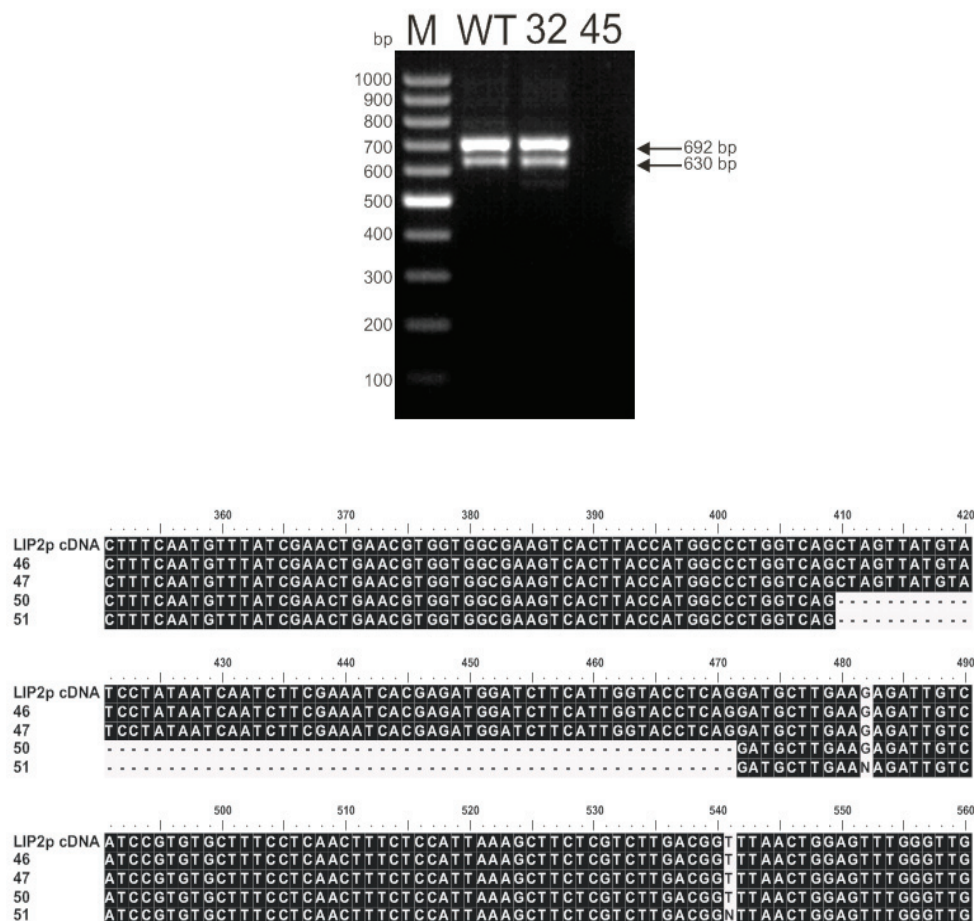


Abbildung 7.2 Sequenzierung der LIP2p RT-PCR-Amplifikate

Oben: Auftrennung der RT-PCR Amplifikate (Primerkombination R1001/R1014) im Agarosegel (Auftrag siehe Abbildung 3.49).

Unten: Alignment der LIP2p-cDNA Sequenz (TAIR) mit den Sequenzen der oberen (46, 47) und unteren (50, 51) Bande

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Photorespiration in Pflanzen	3
Abbildung 1.2 Der Reaktionsmechanismus der Glycin-Decarboxylase in Kooperation mit der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM).	5
Abbildung 1.3 Die Punktmutation der GDC inaktiven Mutante <i>mtkas-1</i> liegt im mtKAS-Gen.	8
Abbildung 1.4 Reaktionsmechanismus der Fettsäurebiosynthese	10
Abbildung 1.5 Reaktionsmechanismus des Liponsäurearms in α -Ketosäure-Dehydrogenasen (A), in der Acetoin-Dehydrogenase (B) und in der Glycin-Decarboxylase (C).....	12
Abbildung 1.6 Strategien der Proteinlipoylierung	14
Abbildung 1.7 Lipoat-Metabolismus in <i>Plasmodium falciparum</i>	17
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Klonierung der LPLA-CTP chimären cds- Sequenzen in den Vektor pASK-IBA7plus.....	32
Abbildung 2.2 Kontrollrestriktion von pASK-IBA7plus/LPLA Plasmiden mit BamHI und HincII zur Überprüfung der Richtung der CTP Sequenz.	33
Abbildung 3.1 Wachstum von <i>mtkas-1</i> und zwei T-DNA-Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp	37
Abbildung 3.2 Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion in <i>mtkas-2</i> und <i>mtkas-3</i>	38
Abbildung 3.3 RT-PCR zum Nachweis der Transkriptgehalte in Blättern von mtKAS-Mutanten	38
Abbildung 3.4 F1-Generation von Kreuzungen der <i>gld1</i> Mutante (<i>mtkas-1</i>) mit T-DNA Knock-out Linien <i>mtkas-2</i> oder <i>mtkas-3</i>	39
Abbildung 3.5 Tageszeitliche Aminosäuregehalte der mtKAS-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp	40
Abbildung 3.6 Anstau von Glyoxylat in den Rosettenblättern von <i>mtkas</i> -Pflanzen.....	41
Abbildung 3.7 Atmungsraten von <i>mtkas-2</i> Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp	42
Abbildung 3.8 Aktivitäten der Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase in <i>mtkas-2</i> Mitochondrien bezogen auf Mitochondrienprotein	43
Abbildung 3.9 Die Lipoylierung des H-Proteins ist vorrangig abhängig von mtKAS- Biosyntheseweg.....	44
Abbildung 3.10 Restliche Proteinlipoylierung der E2-Untereinheiten und des H-Proteins in <i>mtkas</i> -Blattmitochondrien	46
Abbildung 3.11 Proteinlipoylierung der E2-Untereinheiten in <i>mtkas</i> -Wurzeln.....	46
Abbildung 3.12 Aminosäuresequenzvergleich pflanzlicher und bakterieller Lipoat-protein Ligasen	48
Abbildung 3.13 Organspezifische Expression des AtLPLA-Gens	49
Abbildung 3.14 Detektierte AtLPLA Transkriptformen.....	50
Abbildung 3.15 Heterologe Expression und Reinigung von AtLPLA.....	51
Abbildung 3.16 Die AtLPLA ist im Mitochondrium lokalisiert.....	51
Abbildung 3.17 <i>In vivo</i> Lipoylierung der PDH und KGDH E2-Untereinheiten durch AtLPLA	52
Abbildung 3.18 Genetische Komplementation der <i>E. coli lipB/lplA</i> Nullmutante TM137 durch die Expression der AtLPLA cds	53

Abbildung 3.19 Wachstumsstudien von <i>E. coli</i> Stämmen in M9-Minimalmedium.....	55
Abbildung 3.20 Die LPLA aus <i>Arabidopsis</i> zeigt nur marginale Enzymaktivität im <i>in vitro</i> Assay mit ¹⁴ C-Octanoat.	56
Abbildung 3.21 Coomassie gefärbtes SDS-Gel heterolog epxrimierter pflanzlicher LPLAs, chimärer LPLA-CTD Proteine, CTD der <i>E. coli</i> LPLA und unlipoylierter pflanzlicher Apoproteine (H-Protein, KGDH-E2).....	57
Abbildung 3.22 Die Fusion von pflanzlichen LPLAs und der CTD der <i>E. coli</i> LPLA führt zu keiner Erhöhung der <i>in vitro</i> Octanoylierung verschiedener Apoproteine.	58
Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Lage der T-DNA Insertion in Linie SALK_003427 und verwendeter Primer	60
Abbildung 3.24 Der Knock-out der AtLPLA führt zu einem embryoletalen Phänotyp	60
Abbildung 3.25 Erscheinungsbild von AtLPLA-RNAi-Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen	61
Abbildung 3.26 AtLPLA-RNAi-Linien zeigen reduzierte AtLPLA-Transkriptgehalte	61
Abbildung 3.27 Lipoylierungsmuster von Blatt- und Wurzelproteinen der ALPLA-RNAi-Linien	63
Abbildung 3.28 <i>In vitro</i> Lipoylierung von Blattproteinextrakt der AtLPLA-RNAi-Linie 1 und des WT mit <i>E. coli</i> LPLA.....	64
Abbildung 3.29 Transkriptionsstärken von LIP2 (roter Pfeil), AtLPLA und Genen photorespiratorischer Enzyme (Genevestigator).	65
Abbildung 3.30 Im Gegensatz zur AtLPLA wird LIP2 wird vorrangig im Blatt exprimiert	66
Abbildung 3.31 Die Zugabe der EcLPLA führt zu keiner Veränderung im Liponsäure-Gehalt des H-Proteins, erhöht jedoch die Gehalte gebundener Liponsäure der E2-Untereinheiten der PDH und KGDH.	67
Abbildung 3.32 Lipoylierungsstatus von H-Protein-überexprimierenden Arabidopsispflanzen im Vergleich zum Wildtyp.	69
Abbildung 3.33 T-DNA-Insertionslinie <i>lip2-1</i> (SAIL_662_H11).....	71
Abbildung 3.34 Der Knock-out der LIP2 führt zu einem embryoletalen Phänotyp	71
Abbildung 3.35 LIP2-RNAi-Linien zeigen reduzierte LIP2-Gehalte auf Transkript- und Proteinebene	72
Abbildung 3.36 Die Reduktion der LIP2 vermindert die PDH-E2 Lipoylierung, hat jedoch nur geringe Effekte auf die KGDH und das H-Protein	73
Abbildung 3.37 Der Knock-out der LIP1p resultiert in einem embryoletalen Phänotyp	74
Abbildung 3.38 Isolation von homozygoten <i>Arabidopsis</i> LIP2p T-DNA-Insertionsmutanten	75
Abbildung 3.39 Aminosäuresequenz-Alignment von <i>Arabidopsis</i> Lipoyl-Transferasen	76
Abbildung 3.40 Schematische Darstellung der verschieden annotierten Exonstrukturen.....	76
Abbildung 3.41 Organspezifische Expressionsanalysen plastidärer Lipoyl-Transferase-Gene	77
Abbildung 3.42 Western Blot Analysen von LIP2p defizienten <i>Arabidopsis</i> Proteinextrakten mit einem polyklonalen Antiserum gegen LIP2p2	78
Abbildung 3.43 Subzelluläre Lokalisation von LIP2p2 mittels GFP-Fusionsstudien	79
Abbildung 3.44 Genetische Komplementation der <i>E. coli</i> <i>lipB/lpIA</i> Nullmutante TM137 durch die Expression der LIP2p2 cds.....	80
Abbildung 3.45 Wachstum von <i>E. coli</i> TM137 Zellen mit und ohne LIP2p2 Komplementation	81

Abbildung 3.46 Wachstumsraten von <i>E. coli</i> Stämmen bei 37 °C mit (+LA) und ohne (-LA) 500 ng/ml Lipoat.	82
Abbildung 3.47 Positionen der T-DNA untersuchter Linien von Enzymen des plastidären Liponsäure-Metabolismus (schematisch)	83
Abbildung 3.48 Isolation von homozygoten LIP2p2 <i>Arabidopsis</i> T-DNA-Insertionsmutanten	84
Abbildung 3.49 Der Doppel-Knock-out von LIP2p und LIP2p2 führt zur Embryoletalität	85
Abbildung 4.1 Phylogenetische Analysen von Lipoat-protein Ligasen.....	92
Abbildung 4.2 Model der mitochondrialen Proteinlipoylierung in <i>Arabidopsis</i>	96
Abbildung 7.1 Identifizierung der LTA2-Bande in Western Blots mit LA-Antikörper	118
Abbildung 7.2 Sequenzierung der LIP2p RT-PCR-Amplifikate	119

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Überblick über GDC-Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
Tabelle 7.1 Verwendete T-DNA-Insertionsmutanten.....	110
Tabelle 7.2 Verwendete Oligonukleotide.....	110
Tabelle 7.3 Heterolog exprimierte Proteine.....	112
Tabelle 7.4 Verwendete Antikörper	112

7.5 Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
3HP	Hydroxypyruvat
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Aqua
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CAT	Katalase
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
cds	coding sequence
CI	Chloroform/Isoamylalkohol

cM	Centimorgan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid - 5' - triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
E	Extinktion
Ec bzw. <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDC	Glycin-Decarboxylase
GGAT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GGT	Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase
Glx	Glyoxylat
Glyk	Glyceratkinase
GOGAT	Glutamin: Oxoglutarat-Aminotransferase
GOX	Glycolatoxidase
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPR	Hydroxypyruvatreduktase
l	Liter
k	Kilo (10 ³)
LA	Liponsäure
LB	left border
LB	Luria Bertani (Medium)
LIP1 bzw. LIPA	Lipoat-Synthase
LIP2 bzw. LIPB	Octanoyl-[acyl carrier protein]:protein N-octanoyltransferase
LPA	Lipoamidase
LPLA	Lipoat-protein Ligase A
m	Meter
M	Mol pro Liter (molar)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M - MLV - RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus
mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
mRNA	messenger (Boten -) RNA
mtKAS	mitochondriale Beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] - Synthase
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Center
Ni-NTA	Nickel-Trinitiloessigsäure
MS	Murashige und Skoog (Medium)
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamiddinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamiddinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGLP	Phosphoglycolatphosphatase
RB	right border
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rubisco	Ribulose - 1,5 - bisphosphat - Carboxylase/Oxygenase
RuBP	Ribulose - 1,5 - bisphosphat
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGAT	Serin: Glyoxylat - Aminotransferase
SHM	Serinhydroxymethyltransferase
Ta	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris - Acetat - EDTA
TE	Tris - EDTA
T-DNA	Transfer-DNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
VT	Volumenteile

v/v	volume/volume
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

7.6 Publikationen und Tagungsbeiträge

7.6.1 Publikationen

Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2006) The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Plant Physiol* 142: 333-342

Ewald R, Kolukisaoglu U, Bauwe U, Mikkat S, Bauwe H (2007) Mitochondrial protein lipoylation does not exclusively depend on the mtKAS pathway of de novo fatty acid synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 41-48

Engel N, Ewald R, Boldt R, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H (2011) The presequence of *Arabidopsis* serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria and complementation of the photorespiratory *shm1* allele. In Revision

Ewald R, Hoffmann C, Bauwe H (2011) *Arabidopsis* chloroplasts harbour two redundant octanoyltransferases and one indispensable lipoate synthase. In Bearbeitung

7.6.2 Tagungsbeiträge

21. Molekularbiologische Tagung, Dabringhausen, Deutschland (2008)

Poster:

Ewald R, Hasse D, Bauwe H

Mitochondriale Proteinlipoylierung in *Arabidopsis thaliana*.

International congress in Plant Mitochondrial Biology, Hohenroda, Deutschland (2011)

Poster:

Engel N, Gupta KJ, Ewald R, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H

Selective import of *Arabidopsis* serine hydroxymethyltransferase 2 (SHM2) into leaf and root mitochondria depends on its pre-sequence.